

低分子量G蛋白質ADP-ribosylation factor 6によるミエリン髄鞘形成制御

著者	秋山 雅博
発行年	2014
学位授与大学	筑波大学 (University of Tsukuba)
学位授与年度	2014
報告番号	12102甲第7168号
URL	http://hdl.handle.net/2241/00126992

筑 波 大 学

博 士 （ 医 学 ） 学 位 論 文

低分子量 G 蛋白質 ADP-ribosylation
factor 6 によるミエリン髄鞘形成制御

2014

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

秋山 雅博

目次

目次.....	1
第 1 章 序論	
1-1・低分子量 G 蛋白質 Arf6.....	3
1-1-1・低分子量 G 蛋白質とは.....	3
1-1-2・Arf ファミリーとは.....	5
1-1-3・Arf6 の特徴.....	7
1-1-4・Arf6-GEF.....	7
1-1-5・Arf6 によるシグナル伝達.....	8
1-1-6・Arf6-GAP	10
1-1-7・Arf6 の細胞機能.....	11
1-1-8・Arf6 の生理機能の知見.....	14
1-1-9・個体レベルでの Arf6 の生理機能.....	14
1-1-10・個体での Arf6 の発現パターン.....	15
1-1-11・神経細胞における Arf6 の重要性.....	15
1-2・本研究の目的.....	17
第 2 章 材料と方法	
2-1・海馬組織培養.....	18
2-2・Arf6-CKO マウスの作製.....	18
2-3・ウェスタンブロッティング.....	19
2-4・組織染色による解析.....	19
2-5・電子顕微鏡による解析.....	21
2-6・In situ hybridization 法による脳組織での Arf6 mRNA の発現解析.....	21
2-7・個体での BrdU を用いた OPC の発生と遊走の解析.....	23

2-8・細胞遊走能の解析.....	23
2-9・グルタミン酸量の測定.....	24
2-10・Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)による fibroblast growth factor (FGF)-2 量の測定.....	24
2-11・統計解析.....	24
第3章 結果	
3-1・神経系特異的な Arf6 の欠損は海馬采、脳梁でのミエリン髄鞘形成の障害を引き起こす.....	25
3-2・神経系特異的な Arf6 の欠損は海馬采、脳梁のオリゴデンドロサイト数を減少させる.....	28
3-3・神経系特異的な Arf6 の欠損は脳室周辺からの海馬采、脳梁への OPC の遊走を抑制する.....	29
3-4・神経細胞での Arf6 の働きがミエリン髄鞘形成に重要である.....	33
3-5・Arf6 は OPC 遊走ガイダンス因子の放出を制御する.....	38
第4章 考察	42
第5章 結論	44
参考文献	46
謝辞	59

第 1 章 序論

1-1 低分子量 G 蛋白質 Arf6

1-1-1 低分子量 G 蛋白質とは

低分子量 G 蛋白質は、分子量約 20-40 KDa のグアニンヌクレオチド結合蛋白質である。ゲノムプロジェクトの完遂に伴い、現在ヒトでは 100 種類以上の低分子量 G 蛋白質が同定されており、それらは一群のスーパーファミリーを形成している (Takai et al., 2001)。これらの低分子量 G 蛋白質は一次構造の類似性に基づいて少なくとも Ras、Rho、Rab、Ran、Arf の 5 種類のサブファミリーに分類されており、それぞれ主に細胞増殖の制御、アクチン細胞骨格の再構築、小胞輸送の制御、核-細胞質間輸送の制御や小胞出芽の制御など異なる細胞機能を制御していることが明らかとなってきた(図 1a)。

多くの低分子量 G 蛋白質は、通常状態では GDP が結合した不活性化型で存在するが、上流からのシグナルを受け取ることによって結合していた GDP が解離し、新たに GTP と結合することで活性化される。この過程は、上流からのシグナル伝達を受けたグアニンヌクレオチド交換因子(guanine nucleotide exchange factors , GEF)の作用により促進される。活性化された低分子量 G 蛋白質は、様々なエフェクター分子と相互作用し、その細胞内局在を制御するか、あるいはエフェクター分子の活性化状態を変化させる事で、シグナルを下流に伝達する。活性化した低分子量 G 蛋白質は、その後自身の有する GTPase 活性により、結合した GTP を GDP に加水分解し、再び不活化状態へと戻る。このことにより、不活性化した低分子量 G 蛋白質はエフェクター分子と解離し、上流からのシグナル伝達は遮断される。通常、低分子量 G 蛋白質が有する GTPase 活性は低く、活性化型低分子量 G 蛋白質が不活性化型に戻るためには、GTPase 活性化因子(GTPase activating protein, GAP)の補助が必要である。このようにして低分子量 G 蛋白質は、上流からのシグナルに応じて活性化型と不活性化型

の転換を行い、上流のシグナルを下流エフェクター分子へ伝達する『分子スイッチ』として機能している(Bourne et al., 1990) (図 1b)。

a

ファミリー	細胞機能
Ras	細胞増殖
Rho	アクチン細胞骨格の制御
Rab	細胞内小胞輸送
Ran	核細胞質間輸送
Arf	細胞内小胞輸送 / アクチン細胞骨格の制御

b

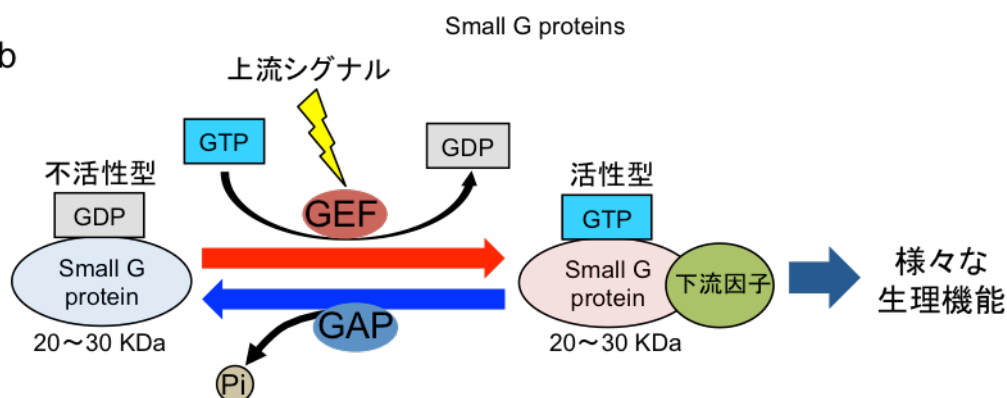


図 1 低分子量 G 蛋白質スーパーファミリー

a. 低分子量 G 蛋白質は一次構造の類似性と細胞機能に基づいて少なくとも Ras、Rho、Rab、Ran、Arf の 5 種類のサブファミリーに分類されており、それぞれのファミリーで異なる生理機能を持つ。

b. 低分子量 G 蛋白質は GDP が結合した不活性化型と GTP が結合した活性化型のサイクルを回っている。活性化型の低分子量 G 蛋白質は様々なエフェクター分子と相互作用することによって多彩な生理機能を発揮する。低分子量 G 蛋白質の活性化は GEF によって、不活性化は GAP によって促進される。

1-1-2 Arf ファミリーとは

ADP-ribosylation factors (Arf)は当初コレラ毒素による三量体 G 蛋白質 Gs の α サブユニットの ADP リボシル化反応を促進するコアファクターとして発見された低分子量 G 蛋白質である(Kahn and Gilma, 1984)。しかし、その後の解析によって、このファミリーに属する蛋白質は主に細胞内小胞輸送における小胞の出芽過程において機能する蛋白質であることが明らかとなっている(Gillingham and Munro, 2007)。現在のところ Arf ファミリー分子に属する低分子量 G 蛋白質としては Arf、Arf-like (Arl)、Arf-related proteins (Arp)、Secretion-associated and Ras-related (SAR) が同定されている(図 2a)(Pasqualato et al., 2002)。なかでも、Arf は最も解析の進んでいる分子であり、以下に示すような様々な知見が蓄積しつつある。

Arf には哺乳類において 6 つのアイソフォームが存在し、さら塩基配列の相同性から 3 つのクラスに分けられる。クラス I には Arf1-3、クラス II には Arf4, 5、クラス III には Arf6 が分類される(図 2b) (Tsuchiya et al., 1991)。クラス I - II に属する Arf は主にゴルジ体や小胞体に局在するが、唯一クラス III に分類される Arf6 はエンドソームや細胞膜に局在している。

このような Arf6 と他の Arf アイソフォーム間での細胞内局在の違いは、Arf6 が他の Arf 分子と機能的に一線を画する 1 つの要因となっている。例えば、クラス I と II の Arf は、主にゴルジ体や小胞体においてコート蛋白質複合体の形成を誘導することにより、小胞体-ゴルジ体間やゴルジ嚢間での小胞輸送を制御している(Donaldson et al., 1992; Helms and Rothman, 1992; Cavenagh et al., 1996; Moss and Vaughan, 1998)。一方、クラス III の Arf6 は主にエンドソームや細胞膜に局在し、アクチン細胞骨格の再構築 (Song et al., 1998; Honda et al., 1999)、細胞接着の制御 (Palacios et al., 2001)、エンドサイトーシス (Radhakrishna and Donaldson, 1997; Altschuler et al., 1999; Radhakrishna

et al., 1999)、エキソサイトーシス (Galas et al., 1997; Vitale et al., 2002) など多くの細胞現象に働いていることが知られている (図 2b)。

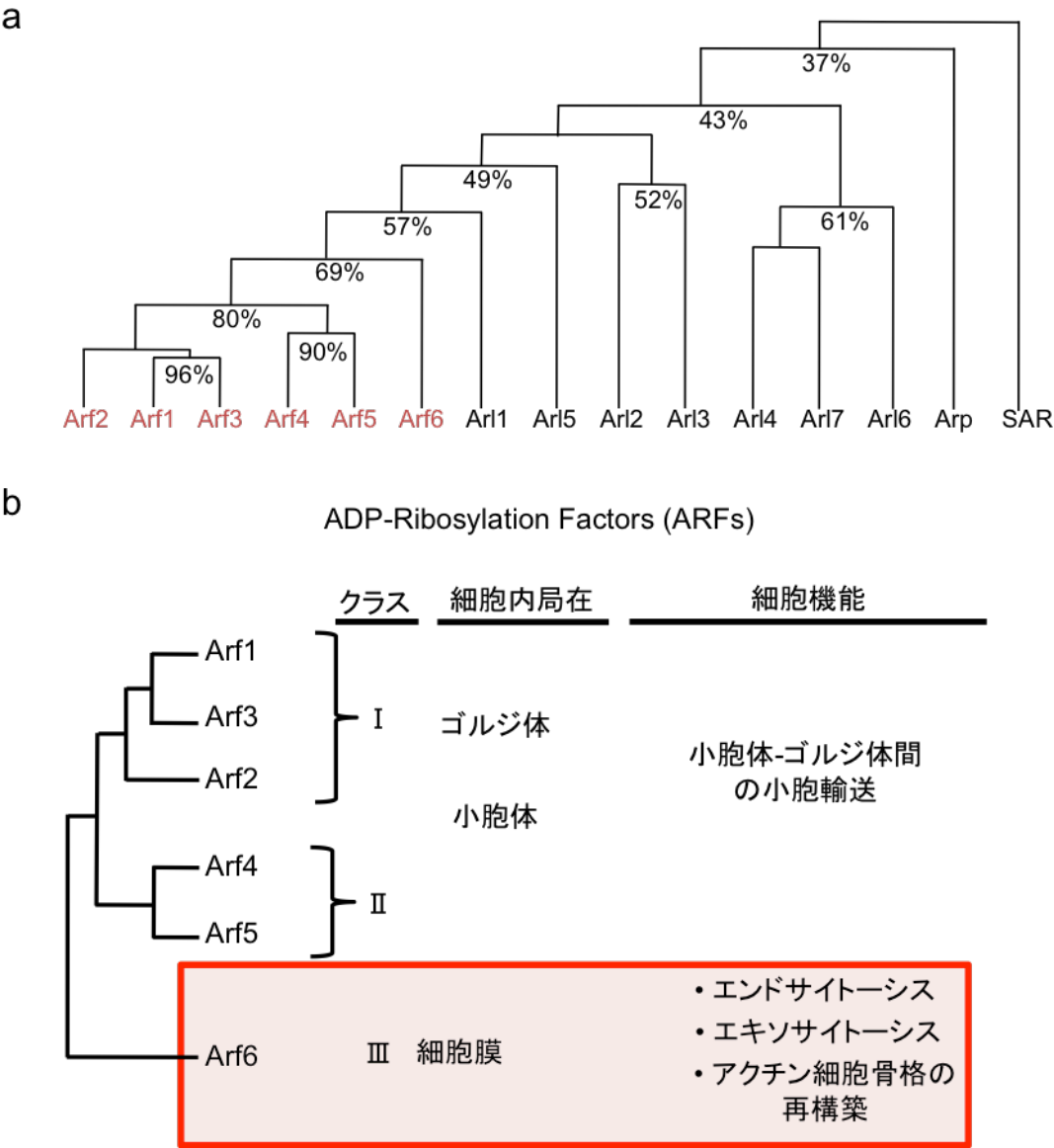


図 2 Arf ファミリー

- a. 現在のところ Arf ファミリー分子に属する低分子量 G 蛋白質としては Arf、Arl、Arp、SAR が同定されている。
- b. Arf には 1～6 の 6 つのアイソザイムが存在し、図に示したように分類される。Arf6 は唯一 ClassIII に分類される Arf であり、他の Class の Arf と異なり細胞膜上に局在しエンドサイトーシスやエキソサイトーシス、アクチン細胞骨格の再構成を制御する。

1-1-3 Arf6 の特徴

Arf6 は構造的に Arf ファミリー内で最も異なっており、特徴的なことに他の Arf ファミリーに比べ高い pI を示す。Arf ファミリーは N 末端部のミリスチル化修飾を介して膜画分に結合する。Arf6 は膜画分に局在するが、それにはこの塩基性の性質の寄与があると考えられている。他の Arf ファミリーがおもにゴルジ体での物質輸送制御に寄与するのに対して、Arf6 は細胞膜-エンドソーム間物質輸送の制御に寄与するという機能的特徴を持つ(Tsuchiya et al., 1991)。

1-1-4 Arf6-GEF

他の低分子 G 蛋白質同様、Arf6 も GDP-GTP サイクルをめぐり、GDP 型の不活性化型と下流のエフェクター分子と相互作用を行う GTP 型の活性化型がある。上記で述べたように、低分子量 G 蛋白質が活性化されるには、GEF による GDP-GTP の交換反応が必要である。Arf-GEF による GDP-GTP の交換反応は、進化的によく保存された約 180 アミノ酸残基からなる触媒ドメイン(sec7 ドメイン)を有する一群の GEF により促進される。これまでの知見から、Arf6 に対する GEF は exchange factor for ARF6 (EFA6)ファミリー、Brefeldin A-Resistant Arf-GEFs (BRAG)ファミリー、Cytohesin ファミリーの 3 つに分類されている(Casanova, 2007)(図 3)。EFA6 ファミリーは最初に同定された Arf6 特異的な GEF であり、EFA6A~D までの 4 つの分子からなるファミリーで、それらのすべてが Arf6 に対する GEF 活性を有している。BRAG ファミリーは BRAG1~3 の 3 つの分子からなるが、このうち BRAG2 のみが Arf6 の GEF として機能する。Cytohesin ファミリーは cytohesin1~4 の 4 つの分子からなり、それらのうち cytohesin2 および cytohesin3 が Arf6 の GEF である。このように多くの GEF が存在するため、Arf6 は様々な細胞外刺激によって活性化され、下流のエフェクター分子にシグナルを伝達する。

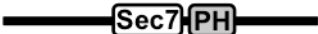





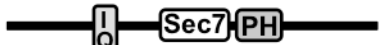

Arf-GEF	ARF 特異性
EFA6 ファミリー	
EFA6A 	Arf6
EFA6B 	Arf6
EFA6C 	Arf6
EFA6D 	Arf6
BRAG ファミリー	
BRAG1 	—
BRAG2 	Arf6
BRAG3 	Arf1
cytohesin ファミリー	
cytohesin-1	Arf1, 5
cytohesin-2 	Arf1~3, 6
cytohesin-3	Arf1, 6
cytohesin-4	Arf1, 5

図 3 Arf6 GEF の分類

Arf-GEF は進化的によく保存された約 180 アミノ酸残基からなる触媒ドメイン(sec7 ドメイン)を有する一群であり、これまでの知見から Arf6 に対する GEF は exchange factor for ARF6 (EFA6)ファミリー、Bredeldin A-resistant Arf-GEF (BRAG)ファミリー、Cytohesin ファミリーの 3 つに分類されている。

CC : コイルドコイル領域、Sec7 : Sec7 ドメイン、PH : プレクスリン相同ドメイン

IQ : IQ モチーフ

1-1-5 Arf6 によるシグナル伝達

GEF によって活性化された Arf6 は次の 3 つの重要な現象を引き起こす。(1) 直接的な phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinases (PIP5K)の活性化、(2) 直接的な phospholipase D (PLD)の活性化、(3)低分子量 G 蛋白質 Rac1 の活性化状態の変化。(1)(2)Arf6 はリン脂質代謝酵素である PIP5K および PLD と直接結合し活性化させることで、リン脂質代謝の変化と phosphatidylinositol

bisphosphate (PIP2)、phosphatidic acid (PA)の産生量を増加させる。産生された PA および PIP2 は細胞内でセカンドメッセンジャーとして機能しており、多彩な細胞機能を制御することが知られている(Stace and Ktistakis, 2006; Di Paolo and De Camilli, 2006)。また、PLD によって産生された PA は PIP5K を直接活性化できると同時に、PIP5K によって産生される PIP2 も PLD と直接結合してその活性化に寄与するため、Arf6 の下流では、これらのセカンドメッセンジャーによるシグナルの増幅が起こる(図 4)(Perez-Mansilla et al., 2006)。

(3)また Arf6 は低分子量 G 蛋白質である Rac1 の活性化状態を変化させることが知られている。Rac1 は Rho ファミリーに属する低分子量 G 蛋白質であり、主にアクチン細胞骨格の制御を介して、細胞接着、細胞運動、細胞増殖等を制御している事が知られている。Arf6 は細胞辺縁部などで Rac1 の活性化を介してアクチン細胞骨格の再構築を行っている。そのため、Arf6→Rac1 のシグナル伝達は、Arf6 が行う細胞骨格の再構築における主要な経路の一つとなっている(図 4)(Premont and Schmalzigaug, 2009)。

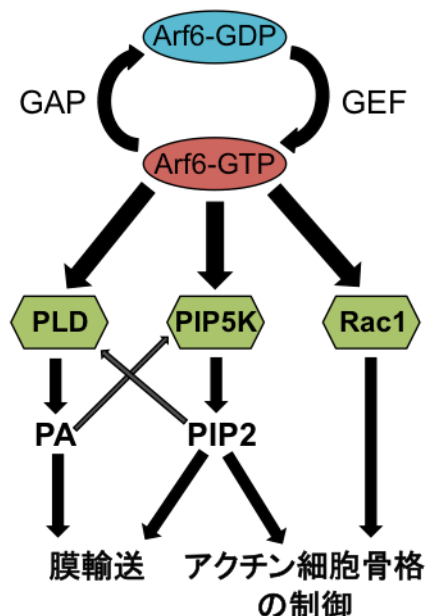


図 4 Arf6 シグナル伝達経路

Arf6 は PLD、PIP5K といったリン脂質代謝酵素や低分子量 G 蛋白質である Rac1 を介したシグナル伝達によって、細胞内小胞輸送やアクチンダイナミクスを制御している。また、PLD によって産生された PA は PIP5K を直接活性化できると同時に、PIP5K によって産生される PIP2 も PLD と直接結合してその活性化に寄与するため、Arf6 の下流ではこれらのセカンドメッセンジャーによるシグナルの増幅が起こる。

1-1-6 Arf6-GAP

活性化型 Arf6 は、他の低分子量 G 蛋白質同様、GAP によって不活性化される。Arf-GAP は、約 120 アミノ酸残基からなるジンクフィンガーモチーフ様の Arf-GAP ドメインを有しており、これらは一次構造やドメイン構成の類似性からいくつかの種類に分類されている。Arf6 に対しては主に SMAPs、GITs、ACAPs、ARAPs が GAP として働く事が報告されている(図 5)(Donaldson and Jackson, 2011; Randazzo et al., 2007)。さらに、近年これら Arf6-GAP は特定の蛋白質と結合し、それら蛋白質を活性化型 Arf6 が局在する細胞内領域にリクルートすることで GAP に結合した蛋白質の働きを制御していることが明らかとなっている。例えば、ACAP1 は、 $\beta 1$ インテグリンと結合することにより、エンドソームから細胞膜への $\beta 1$ インテグリンのリサイクリングに関与する(Li et al., 2006)。さらに、SMAP1 は、エンドサイトーシスに重要な分子であるクラスリンや AP-2 を細胞膜へリクルートすることが知られている(Tanabe et al., 2006)。この事から Arf-GAP には Arf6 に対する GAP としての機能以外に、Arf6 のエフェクター分子としての機能があると言える。


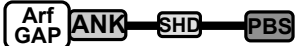


Arf-GAP	ARF 特異性
ACAPs	
ACAP1	Arf6
ACAP2 	Arf6
ACAP3	—
GITs	
GIT1 	Arf1 ~ 3, 5, 6
GIT2	Arf1 ~ 3, 5, 6
ARAPs	
ARAP1	Arf1, 5, 6
ARAP2 	—
ARAP3	Arf6
SMAPs	
SMAP1 	Arf1, 6
SMAP2	Arf1, 6

図 5 Arf6 GAP の分類

Arf-GAP は、約 120 アミノ酸残基からなるジンクフィンガーモチーフ様の Arf-GAP ドメインを有しており、これらは一次構造やドメイン構成の類似性からいくつかの種類に分類されている。Arf6 に対しては主に SMAPs、GITs、ACAPs、ARAPs が GAP として働く事が報告されている。Arf-GAP : Arf-GAP ドメイン、CB : クラスリン・ボックス、PH : プレクスリン相同ドメイン、PBS : パキシリン結合配列、ANK : アンキリンリピート、SHD : Spa 相同ドメイン、BAR : Bin/amphiphysin/RVS167 ドメイン、RA : Ras 結合領域、SAM : sterile α モチーフ、Rho GAP : Rho-GAP ドメイン。

1-1-7 Arf6 の細胞機能

Arf6 の細胞機能は、主に細胞内小胞輸送とアクチン細胞骨格の再構築に大別できる。細胞内小胞輸送としては、種々の受容体のエンドサイトーシスやホルモン、神経伝達物質などのエキソサイトーシス、接着分子の輸送を介した細胞接着の制御が知られている。一方、Arf6 が制御するアクチンダイナミクスとしては、ラッフル膜の形成や、それを介した細胞遊走の制御が知られている(図 6)。

これまでに Arf6 は β 2-アドレナリン受容体やトランスフェリン受容体、E-カドヘリンのクラスリン依存的なエンドサイトーシス、また MHCI やインテグリン、M2 ムスカリン受容体などのクラスリン非依存的なエンドサイトーシスに関与していることが知られている。エンドサイトーシスにおける Arf6 の役割は、クラスリン依存的なエンドサイトーシスでは PIP5K を介して産生した PIP2 や Arf6-GAP である SMAP1 によってエンドサイトーシス部位に AP-2 や dynamin などのエンドサイトーシス関連分子をリクルートすることであると考えられている (Tanabe et al., 2006)。また、クラスリン非依存的なエンドサイトーシスでは細胞膜や蛋白質カーゴの加工に関与している可能性が示されているが詳細なメカニズムについてはいまだ明らかでない (Donaldson et al., 2009)。また、Arf6 は細胞接着をつかさどる分子で細胞と細胞の接着の形成と維持に関わる E-カドヘリンや細胞-細胞外マトリックス間の接着に関わる β 1 インテグリンの細胞内小胞輸送に関与することが知られており、これらの現象を介して、細胞-細胞接着、細胞-細胞外マトリックス間の接着や細胞遊走を制御することが知られている (Powelka et al., 2004; Palacios et al., 2001)。

Arf6 は受容体などを細胞内に取り込むエンドサイトーシスに関与すると同時に、ホルモンや神経伝達物質といった細胞内の物質を細胞外に放出するエキソサイトーシスにも関与していることが知られている。エキソサイトーシスにおいて Arf6 は分泌小胞と細胞膜の融合過程に重要であることが示唆されている。Arf6 は PLD や PIP5K を介して RA と PIP2 を産生し、産生した RA や PIP2 によって分泌小胞と細胞膜の融合を促進させることでエキソサイトーシスの制御に寄与していると考えられている (Zheng and Bobich, 2004)。

細胞内小胞輸送に加え、Arf6 の主要な機能として細胞辺縁部でのアクチン細胞骨格の再構築が知られており、Arf6 はこの機能を介しラッフル膜の形成や細胞遊走を制御していることが報告されている。Arf6 による細胞辺縁部でのアク

チン細胞骨格の再構築はリン脂質代謝酵素である PLD、PIP2 や低分子量 G 蛋白質である Rac1 の活性化を介して行われている。Arf6 は Rac1 の GEF である DOCK180-ELMO 複合体を細胞辺縁部の細胞膜上にリクルートすることで、細胞質内に局在する Rac1 を細胞膜上で活性化させアクチン細胞骨格の再構築を行う (Premont and Schmalzigaug, 2009)。また、Arf6 によって活性化された PLD や PIP5K は細胞辺縁部での PIP2 の集積を引き起こす。この集積した PIP2 は様々なアクチン結合蛋白質と直接結合し、その機能を制御することでアクチン細胞骨格の再構築を制御している。このように Arf6 は細胞辺縁部でのアクチンの再構築を促進させることで、ラッフル膜の形成を誘導する (Honda et al., 1999)。ラッフル膜は細胞遊走において重要な膜構造であるため、Arf6 はラッフル膜の形成を介し細胞遊走に関与するとされている。

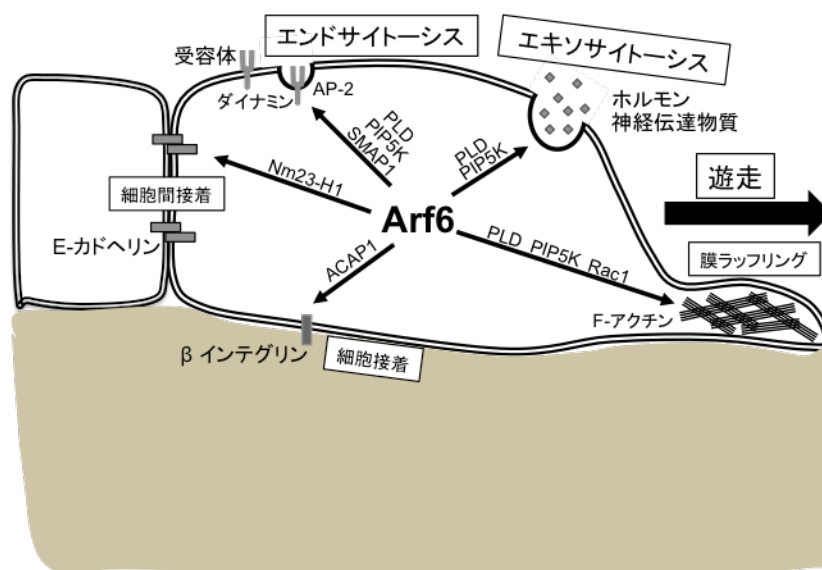


図 6 Arf6 の細胞機能

Arf6 の機能は、主に細胞内小胞輸送とアクチン細胞骨格の再構築に大別できる。細胞内小胞輸送としては、種々の受容体のエンドサイトーシスやホルモン、神経伝達物質などのエキソサイトーシス、接着分子の輸送を介した細胞接着の制御が知られている。一方、Arf6 が制御するアクチン細胞骨格の再構築としては、ラッフル膜の形成やそれを介した細胞遊走の制御が知られている。

1-1-8 Arf6 の生理機能の知見

これまでに Arf6 の生理機能を理解するために、哺乳類の初代培養細胞を使った研究がいくつか行われてきた。ラット肝臓の近位尿細管細胞の初代培養実験において、Arf6 は近位尿細管細胞で受容体を介した cadmium-metallothionein-1 や transferrin のエンドサイトーシスや細胞内小胞輸送に働いていることが報告されている (Wolff et al., 2008)。また、大脳皮質や海馬の神経細胞初代培養実験において Arf6 は神経細胞の発達とシナプス可塑性に関与していることが示されている (Choi et al., 2003; Krauss et al., 2003; Hernandez-Deviez et al., 2004)。さらに、膵臓 β 細胞からのインスリン分泌、胃の壁細胞からの胃酸の分泌に細胞膜上での Arf6 による PIP5K の活性化を介した PIP2 の産生が必要であることが示唆されている (Lawrence and Birnbaum, 2003; Matsukawa et al., 2003)。また、病因との関連において、乳癌細胞の上皮への浸潤や転移に Arf6 の活性が必要であることも報告されている (Hashimoto et al., 2004; Morishige et al., 2008)。これらの研究から Arf6 が哺乳類において幅広い生理現象で重要な役割を担っていること、さらに、病因にも関与していることが推測される。しかし、これらの仮説を解明するためには、個体レベルでの Arf6 の解析が必須である。

1-1-9 個体レベルでの Arf6 の生理機能

Arf6 は上記のように様々な現象に関与することが示されている。しかし、個体における Arf6 の機能は未だにほとんど解明されていない。そこで、個体レベルでの Arf6 の生理機能を解明するために、私の所属する研究室ではこれまでに *Arf6*-knockout (*Arf6*-KO)マウスを作製し、その解析をおこなっている。作製した *Arf6*-KO マウスは肝臓の形成不全による胎生致死であった (Suzuki et al., 2006)。*Arf6*-KO マウスの肝臓は野生型に比べ顕著に小さく、肝臓全体において

アポトーシスの亢進が確認される。その原因として *Arf6*-KO マウスの肝臓では肝細胞増殖因子依存的な肝細胞の運動が抑制されており、そのことにより肝臓形成が十分に進行しないことが示唆された。この報告から個体における *Arf6* は特に肝臓の発達に重要な分子である事が明らかになった。しかし、*Arf6* は胎仔期から成体にわたって全身の臓器でユビキタスに発現する分子であり、肝臓の発達以外にも個体において様々な生理機能を有していることが予想される。

1-1-10 個体での *Arf6* の発現パターン

Arf6 はこれまでの研究から様々な臓器にユビキタスに発現していることがわかっていて (Hosaka et al., 1996)。さらに私が所属する研究室において各種臓器での時空間的(発生段階および組織細胞レベル)な発現パターン解析が行われ、*Arf6* は様々な組織において極性を有する神経細胞や上皮細胞、また分泌細胞に多く発現しており、その発現は時期特異的に変化していることが明らかとなった (Akiyama et al., 2010)。これら、*Arf6* の発現パターンの知見は、これまでの *in vitro* での *Arf6* の細胞機能の知見と合わせ、*Arf6* が生体において特異的な時期や場所で働く事により多彩な生理機能に関与している可能性を示すものである。特に脳組織には高い発現が見られ、脳組織での神経細胞にたいしては、これまでに初代培養実験によって多くの知見が得られており、個体レベルでも *Arf6* が神経細胞において重要な働きをしている可能性が強く示されている。

1-1-11 神経細胞における *Arf6* の重要性

神経細胞においてアクチン細胞骨格の再構成や細胞内小胞輸送は神経の発達に重要な要素の一つである。さらに、発達後、成熟した神経においても、これらの過程はシナプス伝達やシナプス可塑性といった機能を制御している。神経細胞が発達する際の軸索の伸張や樹状突起のブランチングは細胞表面のダイナ

ミックな変化を伴うことが報告されている (Dent and Gertler, 2003; Grosse et al., 1999; Luo, 2002; Matus, 2000; Park et al., 2006; Shirane and Nakayama, 2006; Tojima et al., 2007)。一方、シナプス伝達やシナプス可塑性ではエキソサイトーシスやエンドサイトーシスが神経伝達物質の放出やポストシナプスでの受容体の取り込みに必要である (Esteban, 2003; Malenka, 2003)。さらに、アクチン細胞骨格の再構築もシナプス可塑性に関わっていることが知られている (Fukazawa et al., 2003; Kramar et al., 2006)。

低分子量G蛋白質である Arf6 は細胞膜に局在し、アクチン細胞骨格の再構築、エンドサイトーシス、エキソサイトーシスの制御といった機能を有する分子であり、既に、細胞レベルにおいて、Arf6 が神経細胞の軸索伸張の制御 (Hernandez-Deviez et al., 2004)、樹状突起の制御 (Catherine et al., 2004)、スパインの発生と維持の制御 (Miyazaki et al., 2005) や神経伝達物質の放出 (Zheng and Bobich, 2004) といった神経活動にとって重要な働きをしていることが報告されている (図 7)。しかし、生体における神経組織は複雑なネットワークを形成しており、グリア細胞や神経細胞同士が相互に作用することで複雑で高度な神経機能を持つ。このことから、神経細胞での Arf6 の本来の機能を解析するためには個体レベルでの解析が必須であると考えられる。

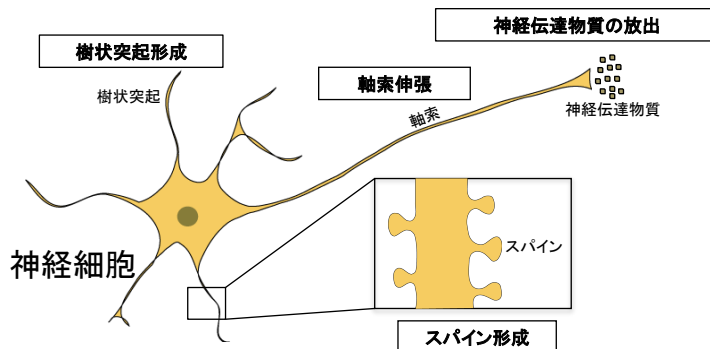


図 7 神経細胞での Arf6 の働き

細胞レベルにおいて、Arf6 は神経細胞の軸索伸張の制御、樹状突起の制御、スパインの発生と維持の制御や神経伝達物質の放出といった神経活動にとって重要な働きをしている。

1-2 本研究の目的

上記のように **Arf6** は、細胞膜やエンドソームに局在し、エンドサイトーシスやエキソサイトーシス、アクチン細胞骨格の制御を介して、多彩な細胞機能に関与する低分子量 G 蛋白質である。**Arf6** は全身において発現が見られるが、神経細胞においても上記の細胞現象を介して、軸索の伸長、樹状突起の分岐、スパインの形成、神経伝達物質の放出などに関与していることが *in vitro* 実験系を用いた研究により報告されている。従って、**Arf6** は神経系において発生から高次機能までの多くの過程で重要な生理機能を担っていると考えられる。しかし、生体における神経組織は複雑なネットワークを形成しており、グリア細胞や神経細胞同士が相互に作用することで複雑で高度な神経機能を持つ。このことから、神経細胞における **Arf6** の機能の実体を解析するためには、個体レベルでの解析が必須である。個体レベルでの解析を行うためには、**KO** マウスの作製とその解析が 1 つの方法である。しかし **Arf6-KO** マウスは胎生致死であり、**Arf6-KO** マウスを用いて神経組織での高次機能の解析を行うことができない。そこで本研究では、神経系特異的な **Arf6-Conditional KO (CKO)** マウスを作製し、**Arf6** が個体レベルでどのような神経機能に関与しているのかを解析することを目的とした。

第 2 章 材料と方法

2-1 海馬組織培養

生後 5 日目の Control マウスと N-*Arf6*-CKO マウスから取り出した海馬組織を Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)に 10% fetal bovine serum (FBS)、100 U/ml penicillin と 100 µg/ml streptomycin を加えた培地で 37°C、5%CO₂ 条件下にて培養機で 3 日間培養した。

2-2 *Arf6*-CKO マウスの作製

Arf6^{lox/lox} マウスは当研究室の本宮らにより作製されたマウスを使用した。Nestin は神経幹細胞に特異的に発現している分子である。この Nestin のプロモーターを利用して Cre recombinase を発現させる Nestin-Cre マウス(Isaka et al., 1999)を京都大学の影山龍一朗先生より分与して頂いた。また、神経細胞特異的に発現している Tau のプロモーターを利用して Cre recombinase を発現させる Tau-Cre マウス(Muramatsu et al., 2008)は大阪大学の原田先生より分与して頂き、オリゴデンドロサイト特異的に発現している 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNP) のプロモーターを利用して Cre recombinase を発現させる CNP-Cre マウス(Lappe et al., 2003)は Max Planck 研究所の Klaus A. Nave 先生より分与して頂いた。

私たちは *Arf6*^{lox/lox} マウスとこれらの Cre マウスを掛け合わせることで神経系特異的な *Arf6*-Conditional Knockout (B-*Arf6*-CKO)、神経細胞特異的な *Arf6*-Conditional Knockout (N-*Arf6*-CKO)、オリゴデンドロサイト特異的な *Arf6*-Conditional Knockout (O-*Arf6*-CKO)マウスを作製した。また、すべての実験において Control マウスとして *Arf6*^{lox/lox} マウスを用いた。

2-3 ウェスタンブロッティング

マウスより摘出した組織を lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), Protease Inhibitor Cocktail (Nacalai Tesque))に入れて氷上でホモジネートした。そして、SDS を最終濃度が 1%になるように加えた。組織溶解物を超音波でさらにホモジネートした後、1,000g、4℃で 20 分間、遠心した。遠心後、上清を回収しサンプルとした。

サンプルは 15% SDS polyacrylamide gel で分離し、polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜(NIPPON Genetics, Tokyo, Japan)に転写した。転写後、PVDF 膜は skim milk buffer (5% skim milk、50 mM Tris-HCl、pH 8.0、20 mM CaCl₂、80 mM NaCl、2% NP-40) で室温にて 1 時間、振とうすることによりブロッキングを行った。ブロッキング後、抗-Arf6 抗体(所属研究室により作製)または、抗-アクチン抗体(Sigma-Aldrich, MO, USA)を含む skim milk buffer 中で室温にて 1 時間、振とうさせた。その後、0.05% Tween 20/ phosphate buffered saline (PBS)で 3 回洗浄し、ペルオキシダーゼ結合 2 次抗体である抗 rabbit IgG 抗体 (Cell Signaling, MA, USA)を含む 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、80 mM NaCl、2mM CaCl₂、2% Nonidet、P-40、0.2% SDS 溶液中、室温で 1 時間振とうさせた。0.05% Tween 20/PBS で 3 回洗浄後、免疫反応性のある蛋白質は、Chemi-Lumi One (Nacalai Tesque)を用いて LAS-4000mini (Fujifilm, Tokyo, Japan)により検出した。

2-4 組織染色による解析

4% paraformaldehyde (PFA) / PBS 溶液を用いて固定したマウスより脳組織を摘出し、さらに後固定として 4% PFA/PBS 溶液中、4℃で 12 時間固定した。固定した脳組織は Hematoxylin-Eosin(HE)染色と luxol fast blue 染色を行うために、パラフィンに包埋し、ミクロトーム(REM-710; Yamato Kohki, Saitama,

Japan)で厚さ 5 μm の組織切片を作製した。作製した組織切片は HE 染色を行うために 100%キシレンで 5 分間浸漬させ、100%、95%、90%、80%、70% のアルコールに各 5 分間浸漬させることにより脱パラフィンを行った。その後、Hematoxylin 溶液に 3 分間浸漬させ、5 分間水洗し、Eosin 溶液に 5 分間浸漬させた後、70%、80%、90%、95%、100%アルコールとキシレンに各 30 秒浸漬させた(脱水、透徹)。また、luxol fast blue (LFB)染色を行うために作製した組織切片は同様に脱パラフィンを行った後、56°Cの luxol fast blue 液に 24 時間浸漬させた。その後、蒸留水で水洗し、炭酸リチウム水溶液に 10 秒浸漬させ、蒸留水で水洗した。水洗後、37°Cのクレシルバイオレット液に 5 分間浸漬させた後、脱水、透徹を行った。

また、免疫組織染色を行うために、後固定した脳組織は 30% sucrose/PBS 溶液中に 4°Cで 2 日間浸した。その後、OCT compound (Sakura Finetek Japan, Tokyo, Japan)に包埋しクリオスタット (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)で厚さ 10 μm の凍結切片を作製した。作製した凍結切片は賦活化処理を行った後、ブロッキング溶液(5% goat serum、0.1% Tween-20、PBS)で室温、30 分間処理した。その後、ブロッキング溶液に希釈した 1 次抗体と 4°Cで一晩反応させ、PBST (0.05% Tween 20/PBS)で室温、5 分間、3 回洗浄した後、ブロッキング溶液に希釈した 2 次抗体および 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI: 4 ng/ml; Molecular Probes, OR, USA)と室温、暗所で 2 時間反応させた。本研究では 1 次抗体には抗 Olig2 抗体 (1:200; Immuno-Biological Laboratories, Gunma, Japan)、抗 cleaved Caspase-3 抗体 (1:1500; Cell Signaling)、抗 BrdU 抗体(1:1000; Sigma-Aldrich)を使用し、2 次抗体には Alexa 488 結合抗 rabbit IgG 抗体、Alexa 546 結合抗 mouse IgG 抗体を使用した。2 次抗体反応後、PBST による洗浄を室温、5 分間、3 回行い、Fluoromount-G (Southern Biotech)を用いて封入した。封入後、Biozero BZ-8000 (KEYENCE, Tokyo, Japan)によっ

て写真撮影を行い、BZ analyzer ソフトウェア(KEYENCE)を使用して画像を解析した。

2-5 電子顕微鏡による脳梁のミエリン鞘解析

Control、B-*Arf6*-CKO と N-*Arf6*-CKO マウスは前固定液(2%グルタルアルデヒド、2%パラフォルムアルデヒド、0.1 M カコジル酸緩衝液(pH7.4))によって還流固定し、脳組織を摘出した。摘出された脳組織は前固定液中で 4℃、24 時間再固定した。再固定後、ビブラトーム(Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)で脳組織を厚さ 100 μm の切片にし、作製した脳組織切片は 1%オスミウム/0.1 M カコジル酸緩衝液で 1 時間処理した後、エタノールとプロピレンオキシドで脱水を行った。脱水後、脳組織切片をエポ樹脂にて包埋し Reichert-Jung ultramicrotome (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)で厚さ 90nm の超薄切片を作製した。作製した超薄切片は酢酸ウランにて染色後、電子顕微鏡(JEM-1400; JEOL, Tokyo, Japan)にて観察した。

2-6 In situ hybridization 法による脳組織での *Arf6 mRNA* の発現解析

cRNA プローブを作成するために、マウス *Arf6* cDNA を鋳型として下記のプライマーを用いて PCR を行い、プローブ領域に相当する DNA 断片を増幅した。

Arf6/01: 5'-CAAGATCTTCGGGAACAAGG-3'

Arf6/02, 5'-GCGTAATACGACTCACTATAGGGCGATAGAGGTTAACCATGTGAGC-3'。

増幅した DNA 断片を用いて digoxigenin-UTP (Roche)存在下で T7 RNA polymerase (Roche)による *in vitro* 転写反応を行い、*Arf6 mRNA* に対する cRNA アンチセンスプローブを合成した。In situ hybridization は Hodge らの方法に従って行った(Hodge et al., 2007)。diethyl ether で麻酔した P5 マウス

を 4%PFA/PBS 50ml で還流固定した後、解剖し、取り出した組織を 4%PFA/PBS 中にて 4°C overnight でさらに固定した。固定した組織は 30% sucrose/PBS にて 4°C overnight で置換した後、OCT compound で包埋し、クリオスタットで厚さ 10 μ m の組織切片にした。作製した組織切片は 4%PFA/PBS 中で室温 10 分間固定し PBS で 3 回洗浄した後、0.1 M triethanolamine /0.25% acetic anhydride に 10 分間浸漬した。浸漬後、PBS で 3 回洗浄し、prehybridization solution (50% formamide, 5 x SSC, 1 x Denhardt's, 250 μ g/ml tRNA, 500 μ g/ml herring sperm DNA) にて 4°C overnight でブロッキングした。 *Arf6* mRNA プロブを hybridization buffer (50% formamide, 300 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM EDTA, 10 mM Na₂HPO₄, 10% dextran sulfate, 1 x Denhardt's, 500 μ g/ml tRNA, 200 μ g/ml herring sperm DNA) で 1000 倍に希釈して組織切片に添加し 65°C overnight でインキュベートした。インキュベート後、組織切片は 65°C の 0.2 x SSC (3.3 mM NaCl, 3.3 mM sodium citrate, pH 7.5) で 30 分 4 回洗浄した。洗浄後、室温の 0.2 x SSC と buffer B1 (0.1 M Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M NaCl) で 5 分間インキュベートし、10% normal sheep serum/PBS で室温、1 時間ブロッキングした後、alkaline phosphatase-conjugated anti-DIG antibody (Roche) を 1% sheep serum/ buffer B1 で 3500 倍に希釈して組織切片に添加し 4°C overnight でインキュベートした。インキュベート後、10% Triton X-100/ buffer B1 で 3 回洗浄し NBT/BCIP (1:200 NBT/BCIP stock solution, Roche) を buffer B2 (0.1 M Tris-HCl, pH 9.5, 0.1 M NaCl, 50 mM MgCl₂) で 500 倍希釈して組織切片に添加し 30°C 暗所で発色させた。

発色後、すべての画像は Biozero BZ-8000 microscope (Keyence, Osaka, Japan)を用いて観察した。

2-7 個体での BrdU を用いた OPC の発生と遊走能の解析

神経幹細胞から新しく生じた OPC をラベルするために BrdU (50mg/kg:体重, Sigma-Aldrich, MO, USA)をマウス腹腔内に注射した。OPC の発生を調べるために、生後 5 日目の Control、B-*Arf6* CKO と N-*Arf6* CKO マウスの腹腔内に BrdU を 1 回注射し、2 時間後に屠殺し脳組織切片を作製した。OPC の遊走を調べるために Control、B-*Arf6*-CKO、N-*Arf6*-CKO マウスの腹腔内に生後 1 日から 10 日の間、毎日 1 回 BrdU を注射し、生後 14 日目で屠殺し脳組織切片を作製した。神経幹細胞から新しく生じた OPC を視覚化するために作製した脳組織切片を抗 BrdU 抗体と抗 Olig2 抗体で染色した。

2-8 細胞遊走能の解析

OPC の遊走は 24-well Boyden chamber (Corning Costar, NY, USA)を用いて測定した。

生後 5 日目の Control マウスから摘出した前脳を papain (10U/ml) と DNase (10U/ml)を加えた DMEM で 37°C、20 分間処理しピッペティングによって細胞を分離した。分離した細胞は 1,000 x g で遠心し、沈殿した細胞を 10%FBS 入り DMEM に 5×10^5 cells/chamber の濃度で再懸濁した後、Upper Chamber に細胞を播いた。Bottom Chamber には生後 5 日目の Control と N-*Arf6*-CKO マウスから摘出した海馬組織と 10%FBS 入り DMEM を入れた。3 日間培養した後、membrane filters を 4%PFA/PBS で固定し、Olig2 抗体で染色した。染色後、membrane filters 裏面の Olig2 陽性細胞の数を BZ-II Analyzer (KEYENCE, Tokyo, Japan)を用いて計測した。

2-9 グルタミン酸量の測定法

Control と *N-Arf6*-CKO マウスの海馬組織培養上清中のグルタミン酸濃度を Glutamate Assay Kit (BioVision, CA, USA)を用いて測定した。測定方法は Assay kit 付属のプロトコールに従って行った。海馬組織培養上清中のグルタミン酸濃度を測定する際、回収した培養液は細胞や細胞片などの混入を除くため遠心を行い、上清を測定サンプルとして用いた。

2-10 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)による fibroblast growth factor (FGF)-2 量の測定

FGF-2 の量は RayBio ® Mouse bFGF2 (FGF-2) ELISA Kit (RayBiotech, GA, USA)を用いて測定した。測定方法は Assay kit 付属のプロトコールに従って行った。海馬組織培養上清中の FGF-2 濃度を測定する際、回収した培養液は細胞や細胞片などの混入を除くため遠心を行い、上清を用いた。また、海馬組織中の FGF2 含有量を測定する際は生後 7 日目の Control、*N-Arf6*-CKO マウスから海馬組織を摘出し、摘出した海馬組織は冷 PBS 中で細かく分割した後、緩衝溶液(20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA と Protease Inhibitor Cocktail)中でホモジネートした。ホモジネート後、懸濁液を 4℃、1,000 x g で 20 分間遠心し、上清 100μl を測定サンプルとして ELISA Kit で FGF2 量を測定した。

2-11 統計解析

本研究の統計処理はすべて Student's t-test または One-way ANOVA with a Dunnett's multiple comparison test を用いて行った。

第 3 章 結果

3-1 神経系特異的な *Arf6* の欠損は海馬采、脳梁でのミエリン髄鞘形成の障害を引き起こす。

Arf6 が関与する神経機能を個体レベルで解析するために、*Arf6*^{flox/flox} マウスと Nestin-Cre マウスを交配させ、神経系特異的な *Arf6*-Conditional Knockout (B-*Arf6*-CKO) マウスを作製した。作製した B-*Arf6*-CKO マウスはウェスタンブロッティングにより *Arf6* 蛋白質が脳組織特異的に欠損していることを確認した(図 8a)。また、B-*Arf6*-CKO マウスはメンデルの法則に従って出生し、成体まで成長した。この間、特に目立った行動異常は観察されなかった。さらに脳を摘出・観察したところ、形態には大きな異常は見られなかった(図 8b)。

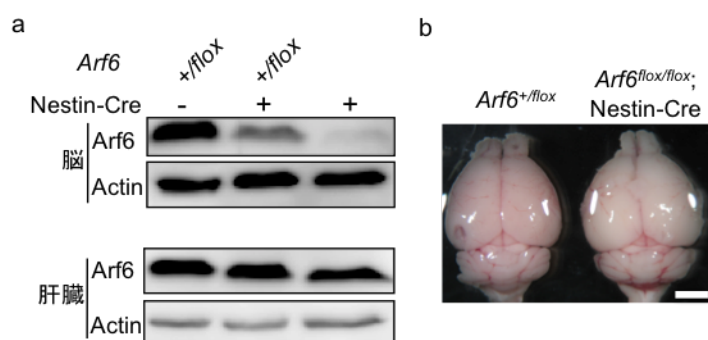


図 8 B-*Arf6*-CKO マウスでの *Arf6* 蛋白質の発現と脳構造の解析

- ウェスタンブロッティングによる全脳と肝臓での *Arf6* 蛋白質の発現レベルを解析した。
- Control マウスと B-*Arf6*-CKO マウスの全脳の構造を比較した。Scale bar : 2.5 mm。

次に Control と B-*Arf6*-CKO 成体マウスの脳組織切片を作製し、Hematoxylin-Eosin(HE)染色により、組織学的解析を行った(図 9a)。その結果、海馬への入出力を担う海馬采が Control マウスに比べ B-*Arf6*-CKO マウスで細いことがわかった(図 9b)。また、左右の大脳皮質間を連絡する脳梁も Control マウスより有意に細かった(図 9c)。

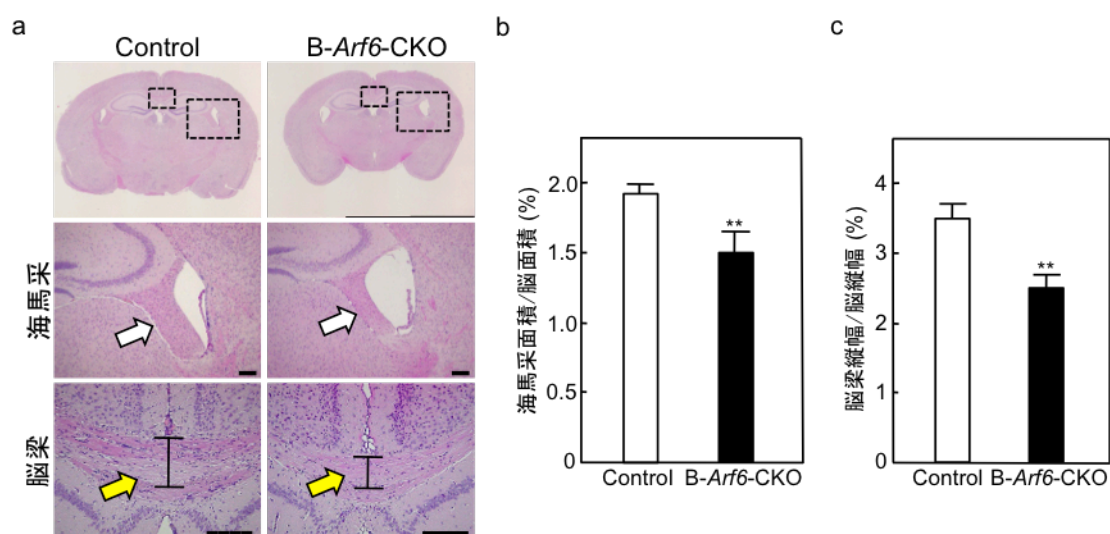


図9 B-*Arf6*-CKO の脳における組織解析

- a. 生後 90 日目の Control マウスと B-*Arf6*-CKO マウスの脳組織切片を HE 染色した。
白矢印：海馬採、黄色矢印：脳梁。Scale bar：200 μ m。
- b. 脳全体の面積に対する海馬採の面積の割合を計測した。** $P < 0.01$ 。
- c. 脳の背側-腹側の幅に対する脳梁の幅の割合を計測した。** $P < 0.01$ 。

海馬採や脳梁は神経軸索の束で構成されており、その軸索は絶縁性のリン脂質の層であるミエリン髓鞘によって高度に有髓化されている(Luders et al., 2010; Paul et al., 2007; Cassel et al., 1997)。そこで、次に私は海馬採、脳梁でのミエリン髓鞘への *Arf6* 欠損の影響を調べるため、脳組織切片に対しミエリン髓鞘を染上げる luxol fast blue (LFB)染色を行った。その結果、B-*Arf6*-CKO マウスの海馬採と脳梁での LFB の染色度合いは Control マウスに比べ顕著に低かった(図 10a)。このことから、B-*Arf6*-CKO マウスの海馬採、脳梁では軸索のミエリン髓鞘が減少している可能性が示唆された。そこで私は、B-*Arf6*-CKO マウスの海馬採、脳梁でのミエリン髓鞘の減少を直接確認するために、電子顕微鏡による解析を行った。電子顕微鏡による解析の結果、B-*Arf6*-CKO マウスの海馬採、脳梁の領域では Control マウスと比べ、ミエリン化された太い有髓神経線維が劇的に減少していることが確認できた(図 10b, c および 11)。

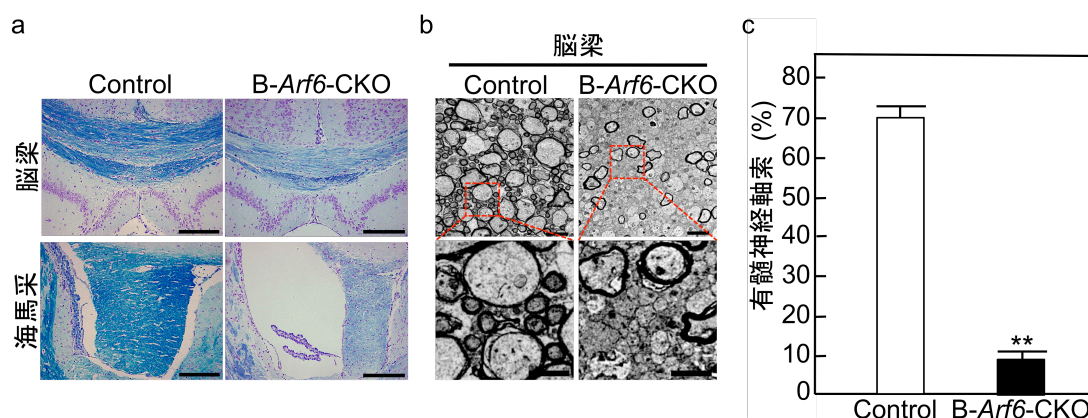


図 10 神経系特異的な *Arf6* 欠損による海馬采、脳梁でのミエリン髄鞘形成に対する影響の検討

- a. 生後 90 日目の Control マウスと B-*Arf6*-CKO マウスの海馬采、脳梁を LFB 染色した。
Scale bar : 200 μ m。
- b. 生後 90 日目の Control マウスと B-*Arf6*-CKO マウスの脳梁の電子顕微鏡写真。
Scale bar : 2 μ m。
- c. 生後 90 日目の Control マウスと B-*Arf6*-CKO マウスの脳梁でのミエリン化された軸索の割合を計測した。 ** $P < 0.01$ 。

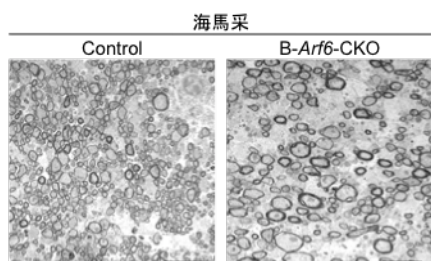


図 11 海馬采に対する電子顕微鏡によるミエリン髄鞘の解析

生後 90 日目の Control マウスと B-*Arf6*-CKO マウスの海馬采の電子顕微鏡写真。
Scale bar : 5 μ m。

これらの結果から *Arf6* が中枢神経系においてミエリン髄鞘の形成に関与している事が示された。また、興味深いことに、他の有髄神経領域(脳弓, 大脳脚, 小脳)では海馬采や脳梁で見られたような劇的な LFB 染色度合いの減少は見られなかった (図 12)。

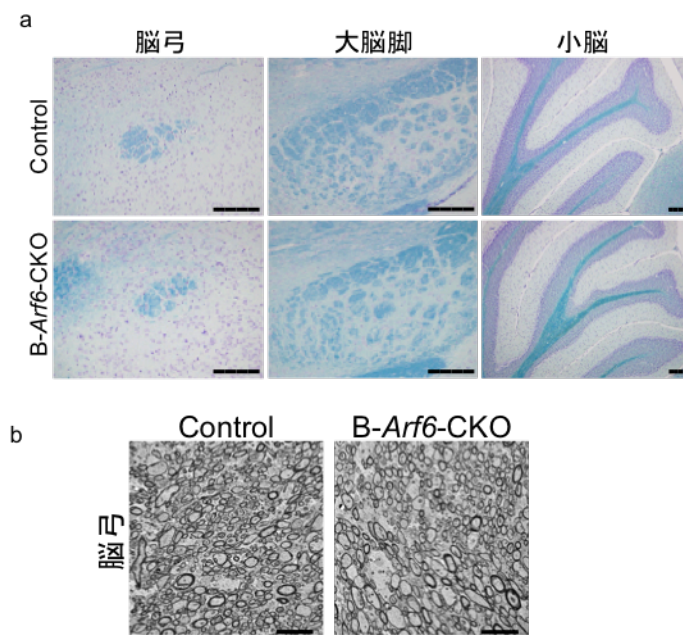


図 12 神経系特異的な *Arf6* 欠損による脳弓, 大脳脚, 小脳でのミエリン髄鞘形成に対する影響の検討

- a. 生後 90 日目の Control マウスと *B-Arf6*-CKO マウスの脳弓, 大脳脚, 小脳に対する LFB 染色。
Scale bar : 200 μ m。
- b. 生後 90 日目の Control マウスと *B-Arf6*-CKO マウスの脳弓の電子顕微鏡写真。
Scale bar : 5 μ m。

3-2 神経系特異的な *Arf6* の欠損は海馬采、脳梁のオリゴデンドロサイト数を減少させる。

中枢神経系においてミエリン髄鞘形成はグリア細胞の 1 つであるオリゴデンドロサイトによって行われている (Aggarwal et al., 2011)。そこで、私は次に *Arf6* 欠損によるオリゴデンドロサイトへの影響を調べるため、生後 14 日目の Control、*B-Arf6*-CKO マウス脳組織切片に対し、オリゴデンドロサイトのマーカーである Olig2 蛋白質を抗 Olig2 抗体によって免疫染色した。その結果、Control マウスに比べ *B-Arf6*-CKO マウスの海馬采、脳梁ではオリゴデンドロサイトの数が顕著に少ないことがわかった (図 13)。

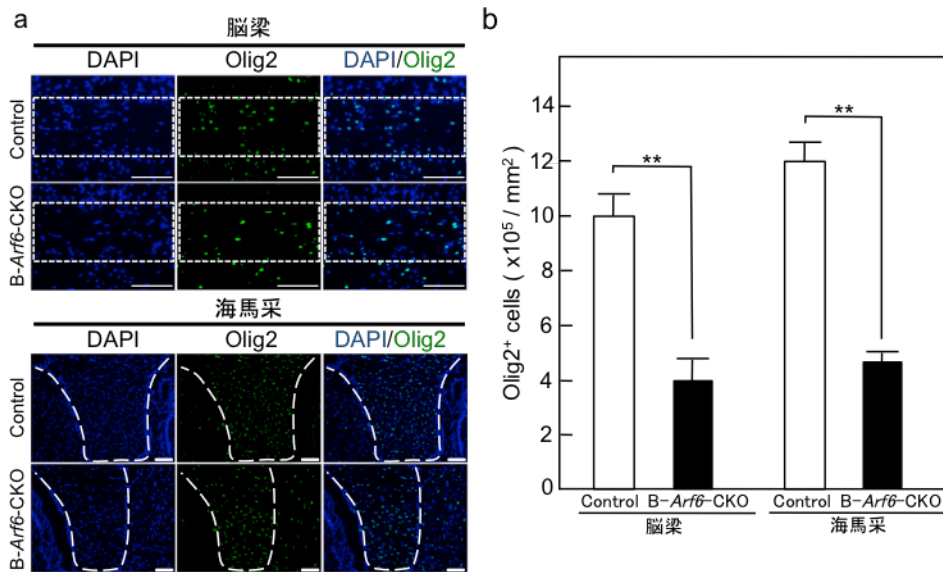


図 13 神経系特異的な *Arf6* 欠損による海馬采、脳梁でのオリゴデンドロサイトに対する影響の検討

- a. 生後 14 日目の Control マウスと *B-Arf6*-CKO マウスの海馬采、脳梁を抗 Olig2 抗体(緑色)と DAPI(青色)で染色した。白色点線：海馬采と脳梁。Scale bar：100 μ m。
- b. 海馬采、脳梁 での Olig2 陽性の細胞数を測定した。 ** $P < 0.01$ 。
- Olig2：オリゴデンドロサイトのマーカー

3-3 神経系特異的な *Arf6* の欠損は脳室周辺からの海馬采、脳梁への OPC の遊走を抑制する。

上記の結果において *B-Arf6*-CKO マウスの海馬采、脳梁のオリゴデンドロサイトの数は生後 14 日目で既に減少していた(図 13)。マウスでのミエリン髄鞘形成は主に生後 14 日目以降から開始される(Hamano et al., 1998; Baumann and Pham-Dinh 2001)。このことから、*B-Arf6*-CKO マウスの海馬采や脳梁でオリゴデンドロサイト数が少ないのはミエリン髄鞘形成後の要因(例えばミエリン髄鞘のメンテナンス異常など)によるものではなく、ミエリン髄鞘形成過程に要因があると考えられた。

オリゴデンドロサイトによるミエリン髄鞘形成過程は、まず脳室周辺などで

オリゴデンドロサイトの前駆体である Oligodendrocyte precursor cell (OPC)が神経幹細胞より生じ、その後、標的の領域まで遊走する。遊走後、OPC はオリゴデンドロサイトへ分化、成熟化してミエリン髄鞘を形成する(de Castro and Bribián, 2005; Klämbt, 2009; Miller, 2002)(図 14)。そのため、B-Arf6-CKO マウスの海馬采や脳梁でのオリゴデンドロサイトの数が少なかった事の原因として 2 つの可能性が考えられた。1 つ目は神経幹細胞から発生する OPC の数が減少している可能性であり、2 つ目は発生後の OPC の遊走に異常があり、海馬采や脳梁などの標的領域へ正常に OPC が辿り着けていない可能性である。

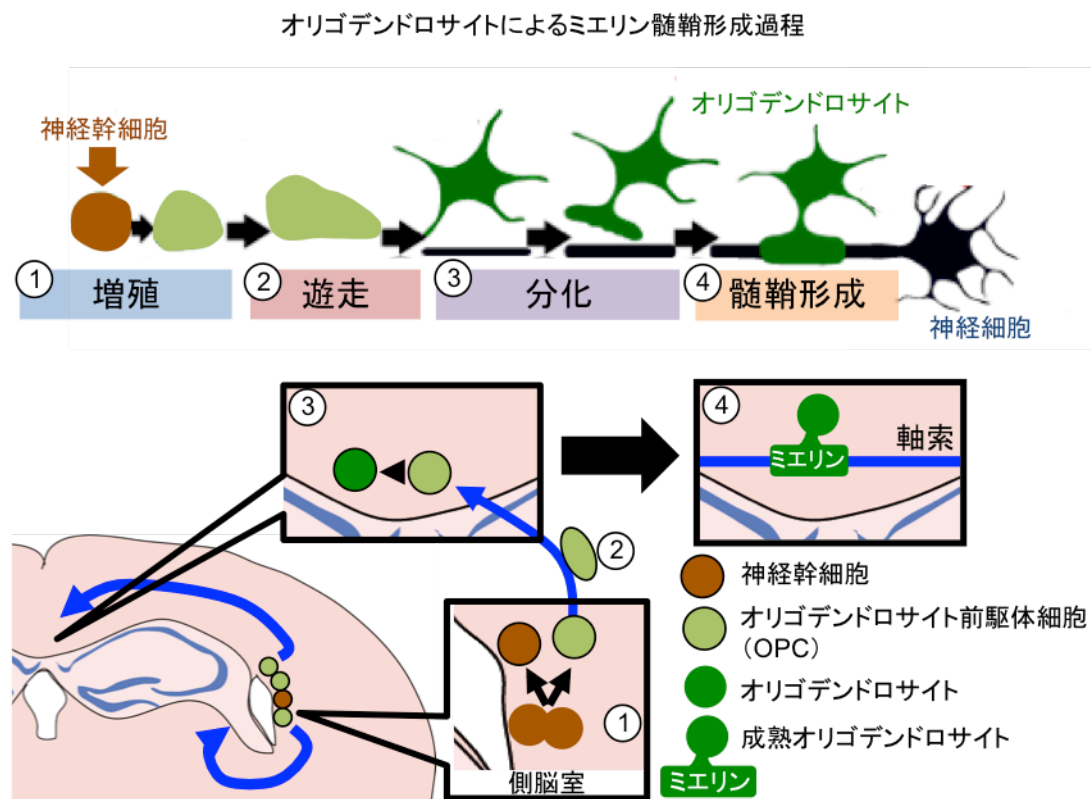


図 14 オリゴデンドロサイトによるミエリン髄鞘形成過程

- ①; 脳室周辺において神経幹細胞より oligodendrocyte precursor cell (OPC)が生じる。
- ②; 脳室周辺で発生した OPC が脳梁や海馬采などの有髄神経領域へ遊走する。
- ③; 有髄神経領域へと遊走して来た OPC がオリゴデンドロサイトへと分化する。
- ④; 成熟したオリゴデンドロサイトが神経軸索へ巻き付く事でミエリン髄鞘を形成する。

私はこれらの可能性を検討するために BrdU を用いた実験を行った。BrdU は細胞が分裂した際に細胞に取り込まれることから、神経幹細胞から発生した細胞をラベルするために用いた。さらに、神経幹細胞より発生した OPC を識別するために、Olig2 蛋白質を OPC のマーカーとした。つまり、BrdU と Olig2 の両方が陽性な細胞を神経幹細胞から新しく生じた OPC であると判断した。実験の結果、側脳室周辺の BrdU と Olig2 の両方が陽性な細胞数は Control マウスと B-*Arf6*-CKO マウスでの間に大きな違いは見られなかった(図 15)。

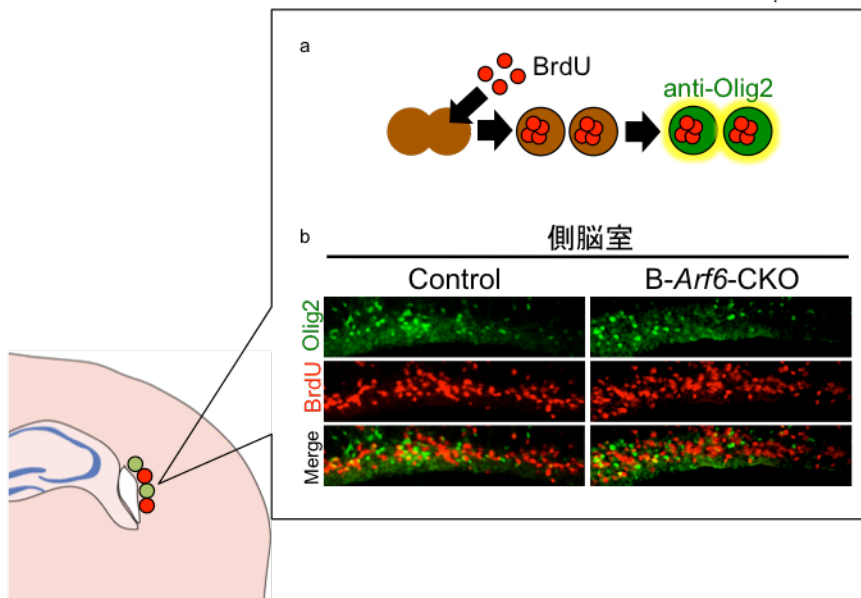


図 15 神経系特異的な *Arf6* 欠損による側脳室周辺での OPC の発生に対する影響の検討

- 細胞が分裂した際に取り込まれる BrdU を用いて、側脳室で神経幹細胞より分裂した細胞をラベルする。ラベルされた細胞を抗 Olig2 抗体で染色する事で神経幹細胞より発生した OPC を検出する。
- 生後 5 日目の Control マウスと B-*Arf6*-CKO マウスに BrdU を投与し、投与 2 時間後の Control マウスと B-*Arf6*-CKO マウスの側脳室領域を抗 Olig2 抗体(緑色)と抗 BrdU 抗体(赤色)で染色した。

Olig2 : オリゴデンドロサイト/OPC のマーカー

一方、OPC の遊走先である海馬采や脳梁での BrdU と Olig2 の両方が陽性な細胞の数は Control マウスに比べ B-*Arf6*-CKO マウスで有意に少なかった(図 16 および 17)。このことから Control マウスに比べ B-*Arf6*-CKO マウスの海馬采や

脳梁でのオリゴデンドロサイトの数が少ない原因は、神経幹細胞から分化する OPC の数が減少しているからではなく、発生後の OPC の遊走に異常があり、標的領域へ正常に OPC が辿り着けていない事が主な原因であると考えられた。

これらの結果から、*B-Arf6*-CKO マウスでのミエリン髄鞘の不形成は OPC の遊走障害によって、海馬采、脳梁でのオリゴデンドロサイトの数が少なくなった事に起因していると考えられた。

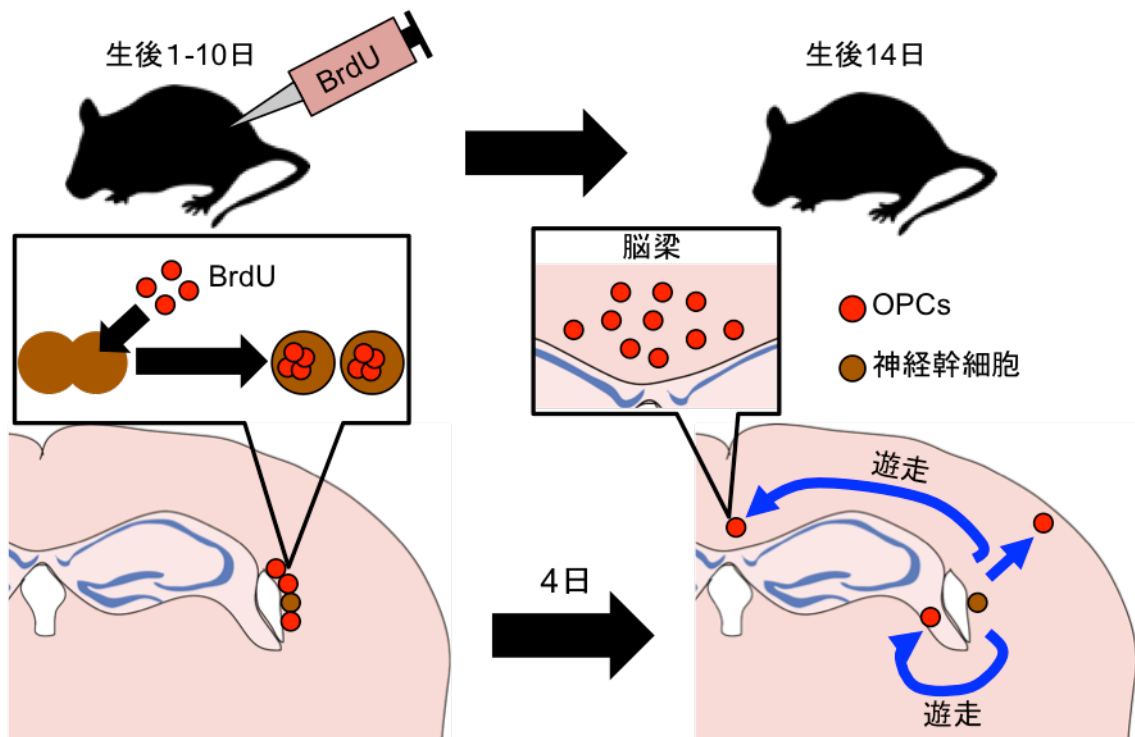


図 16 *in vivo* での OPC 遊走能の測定方法の模式図

生後 1 日目から 10 日目までの間、マウスに BrdU を投与し、その期間に発生した OPC を BrdU にてラベルする。その後、ラベルした OPC が目的組織領域へと遊走するのを数日間待ち、BrdU 陽性な OPC を目的組織領域で検出することで、*in vivo* での OPC の遊走能を測定した。

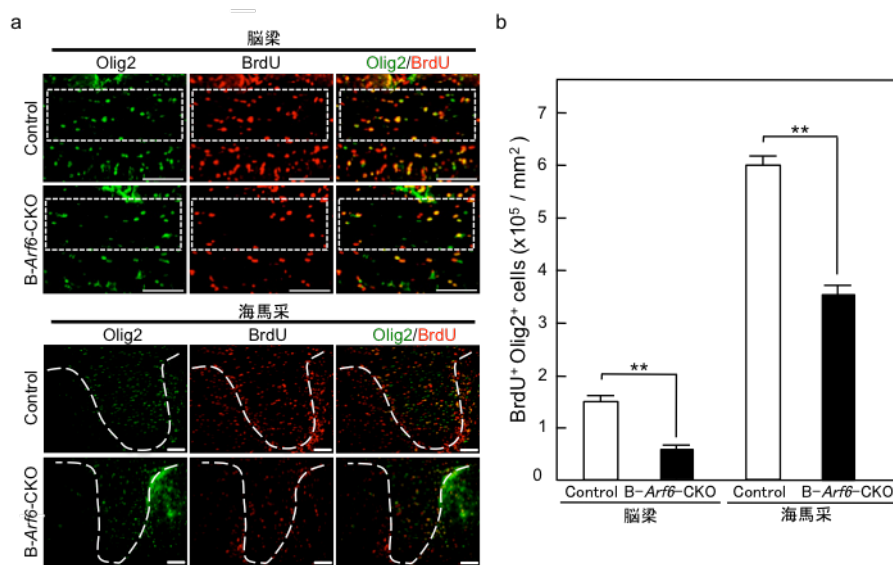


図 17 神経系特異的な Arf6 欠損による脳室周辺から海馬采、脳梁への OPC の遊走に対する影響の検討

- a. 生後 1 日目から 10 日目までの間 Control マウスと B-*Arf6*-CKO マウスに BrdU を投与し、生後 14 日目で Control マウスと B-*Arf6*-CKO マウスの海馬采と脳梁を抗 Olig2 抗体(緑色)と抗 BrdU 抗体(赤色)で染色した。白色点線：海馬采または脳梁。Scale bar：100 μm。
- b. 海馬采、脳梁 での Olig2/BrdU 陽性の細胞数を測定した。** P < 0.01。
Olig2：オリゴデンドロサイト/OPC のマーカー

3-4 神経細胞での Arf6 の働きがミエリン髄鞘形成に重要である

私が作製した B-*Arf6*-CKO マウスは神経幹細胞で Arf6 が欠損している。つまり、B-*Arf6*-CKO マウスでは、神経幹細胞より生じる、神経細胞、グリア細胞の両方で Arf6 が欠損していることになる。そのため、これまでの Arf6 欠損によるミエリン髄鞘形成に対する影響が神経細胞、グリア細胞のどちらの細胞に起因するのかは不明なままであった。そこで、私は Arf6 欠損によるミエリン髄鞘形成への影響がどの細胞種での Arf6 に起因するのかを調べるために、新たに神経細胞特異的な *Arf6*-CKO (N-*Arf6*-CKO)マウスとオリゴデンドロサイト特異的な *Arf6*-CKO (O-*Arf6*-CKO)マウスを作製した。作製した両マウスに対し組

組織学的解析を行った結果、N-*Arf6*-CKO マウスで B-*Arf6*-CKO マウスと同様な表現型(海馬采、脳梁の萎縮)が見られたのに対し O-*Arf6*-CKO マウスでは見られなかった(図 18)。

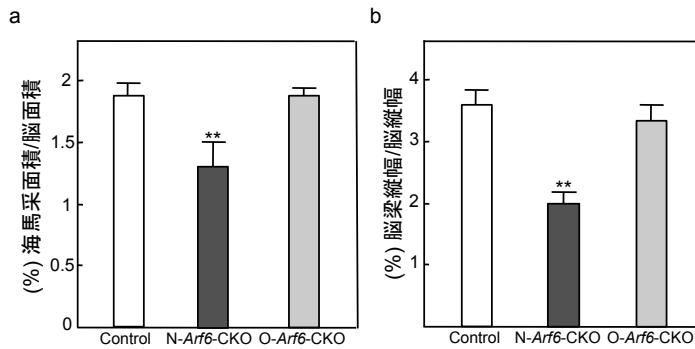


図 18 N-*Arf6*-CKO マウスと O-*Arf6*-CKO マウスの海馬采、脳梁の組織解析

- a. 脳全体の面積に対する海馬采の面積の割合を測定した。** $P < 0.01$ 。
- b. 脳の背側-腹側の幅に対する脳梁の幅の割合を測定した。** $P < 0.01$ 。

さらにLFB染色と電子顕微鏡による解析からN-*Arf6*-CKOマウスの脳梁と海馬采でミエリン髄鞘形成の障害が確認された(図 19)。これらのことから、神経細胞での*Arf6*の欠損がミエリン髄鞘形成不全を引き起こしている事が示され、神経細胞での*Arf6*の働きがミエリン髄鞘形成に重要である事が示唆された。

また、*Arf6*の発現はmRNAレベルにおいて大脳皮質や海馬に高く、グリア細胞と軸索で構成される脳梁や海馬采で低いことから、中枢神経系において*Arf6*は主に神経細胞に発現し機能している事が考えられた(図 20)。

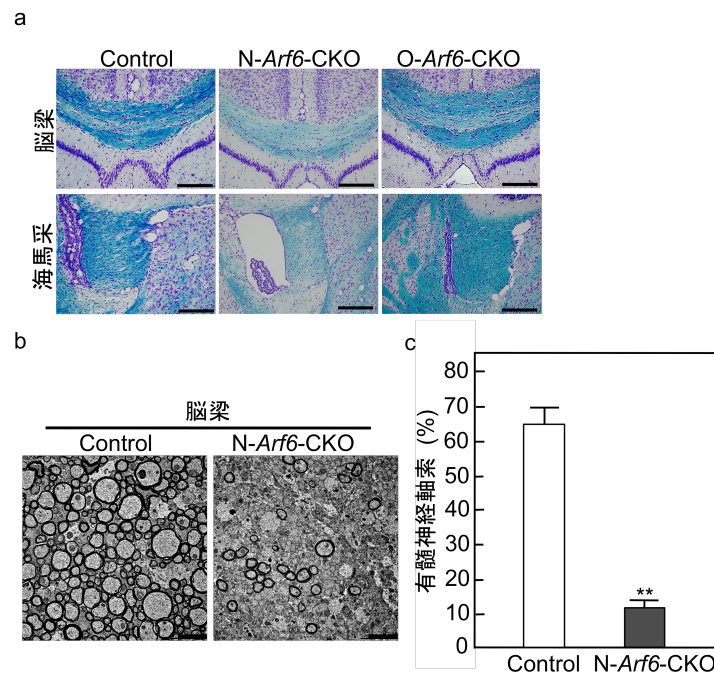


図 19 神経細胞特異的または、オリゴデンドロサイト特異的な *Arf6* 欠損による海馬采、脳梁でのミエリン髄鞘形成に対する影響の検討

- a. 生後 90 日目の Control マウス、N-*Arf6*-CKO マウス、O-*Arf6*-CKO マウスの海馬采、脳梁を LFB 染色した。Scale bar : 200 μ m。
- b. 生後 90 日目の Control マウスと N-*Arf6*-CKO マウスの脳梁の電子顕微鏡写真。Scale bar : 2 μ m。
- c. 生後 90 日目の Control マウスと N-*Arf6*-CKO マウスの脳梁でのミエリン化された軸索の割合を測定した。** $P < 0.01$ 。

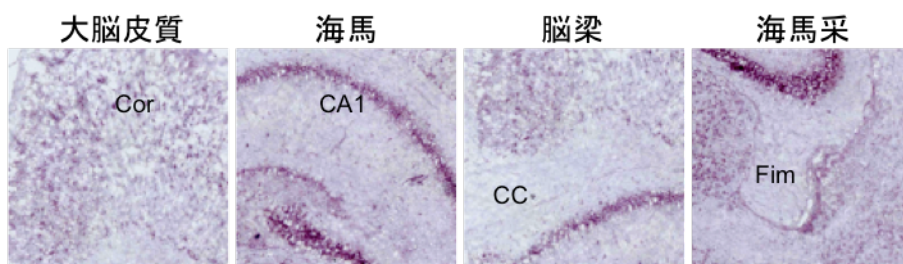


図 20 脳組織での *Arf6* mRNA の発現解析

生後 5 日目の野生型マウスの脳組織における *Arf6* mRNA の発現を in situ hybridization 法にて解析した。Cor : 大脳皮質、CA1 : Cornet d'Ammon1、CC : 脳梁、Fim : 海馬采

次に私は、N-*Arf6*-CKO マウスでのミエリン髄鞘不形成が B-*Arf6*-CKO マウスと同様に OPC の遊走障害によって、海馬采、脳梁でのオリゴデンドロサイトの数が少なくなる事に起因しているかを調べた。その結果、N-*Arf6*-CKO マウスの海馬采、脳梁でのオリゴデンドロサイトの数は B-*Arf6*-CKO マウスと同様に Control マウスに比べ有意に少なくなっていた(図 21)。

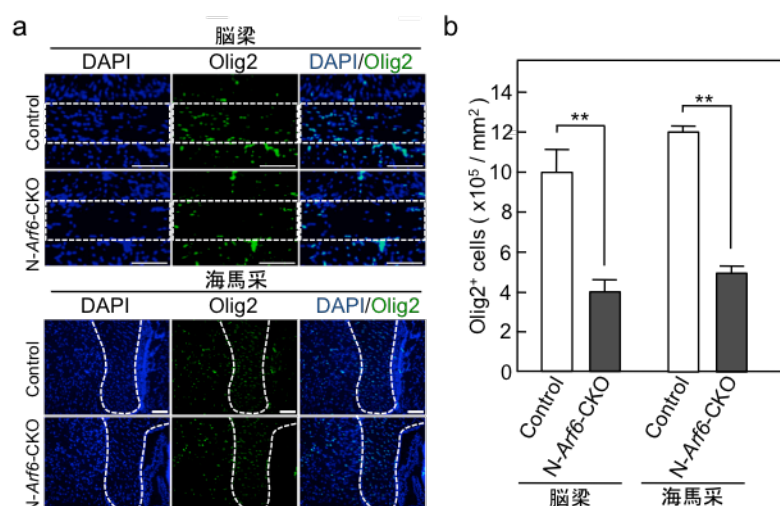


図 21 神経細胞特異的な *Arf6* 欠損による海馬采、脳梁でのオリゴデンドロサイトに対する影響の検討

- a. 生後 14 日目の Control マウスと N-*Arf6*-CKO マウスの海馬采、脳梁を抗 Olig2 抗体(緑色)と DAPI(青色)で染色した。白色点線：海馬采と脳梁。Scale bar : 100 μm。
b. 海馬采、脳梁での Olig2 陽性の細胞数を測定した。** P < 0.01。
Olig2 : オリゴデンドロサイト/OPC のマーカー

また、側脳室周囲での OPC の発生には異常がみられない一方、海馬采、脳梁への OPC の遊走には異常が見られた(図 22 および 23)。さらに私は細胞死によって海馬采、脳梁でのオリゴデンドロサイトの数が減少している可能性を調べるため、海馬采、脳梁でのアポトーシスを抗 Cleaved Caspase-3 抗体による免疫染色によって検出した。その結果、N-*Arf6*-CKO マウスの海馬采、脳梁でのアポトーシスの増加は見られなかった(図 24)。これらのことから、N-*Arf6*-CKO マウスでのミエリン髄鞘不形成が B-*Arf6*-CKO マウスと同様に OPC の遊走障害

によって、海馬采、脳梁でのオリゴデンドロサイトの数が少なくなる事に起因していることがわかった。

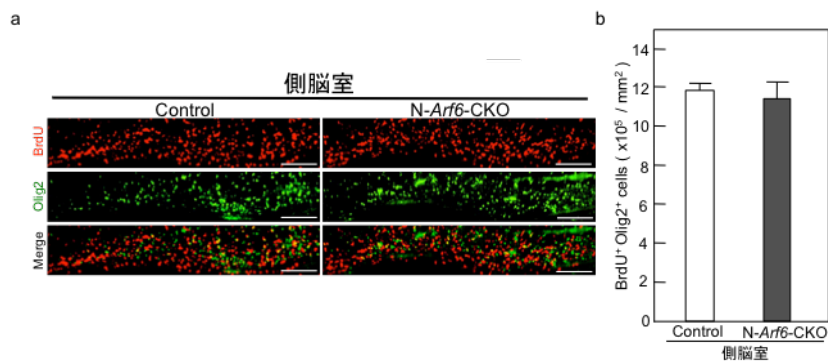


図 22 神経細胞特異的な Arf6 欠損による側脳室での OPC の発生に対する影響の検討

- a. 生後 5 日目の Control マウスと N-*Arf6*-CKO マウスに BrdU を投与し、投与 2 時間後の Control マウスと N-*Arf6*-CKO マウスの側脳室領域を抗 Olig2 抗体(緑色)と抗 BrdU 抗体(赤色)で染色した。Scale bar: 100 μ m。
- b. 側脳室領域における BrdU/Olig2 両陽性な細胞の数を測定した。
Olig2 : オリゴデンドロサイト/OPC のマーカー

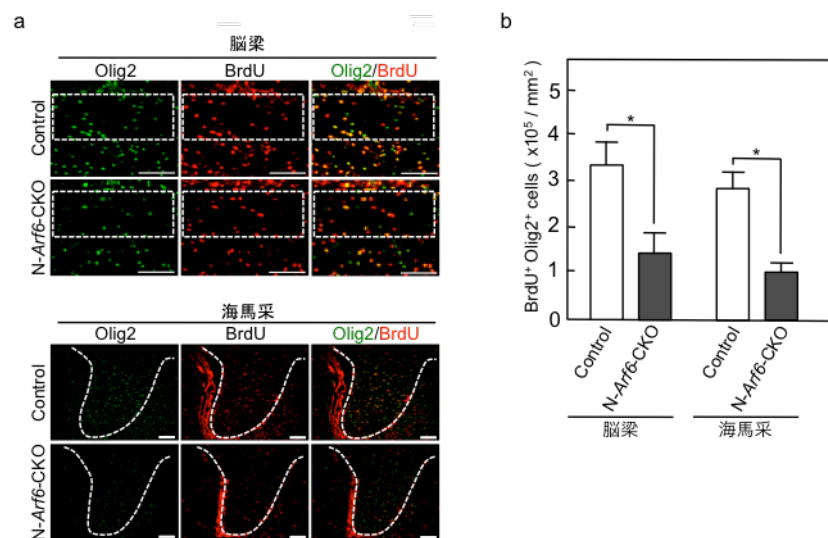


図 23 神経細胞特異的な Arf6 欠損による脳室周辺から海馬采、脳梁への OPC の遊走に対する影響の検討

- a. 生後 1 日目から 10 日目までの間 Control マウスと N-*Arf6*-CKO マウスに BrdU を投与し、生後 14 日目で Control マウスと N-*Arf6*-CKO マウスの海馬采、脳梁を Olig2 抗体(緑色)と抗 BrdU 抗体(赤色)で染色した。白色点線 : 海馬采と脳梁。Scale bar : 100 μ m。
- b. 海馬采、脳梁 での Olig2 / BrdU 陽性の細胞数を測定した。* $P < 0.05$ 。
Olig2 : オリゴデンドロサイト/OPC のマーカー

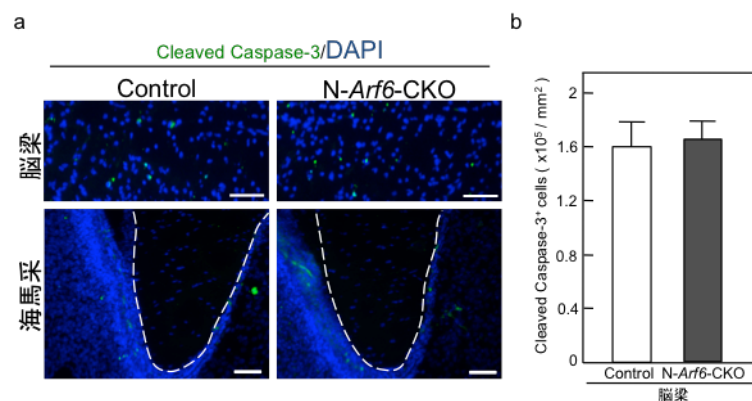


図 24 神経細胞特異的な Arf6 欠損の海馬采、脳梁での細胞の生存に対する影響の検討

a. 生後 5 日目の Control マウスと N-Arf6-CKO マウスの海馬采、脳梁を抗 Cleaved Caspase3 抗体(緑色)と DAPI(青色)で染色した。白色点線：海馬采と脳梁。Scale bar : 50 μ m。

b. 脳梁 での Cleaved Caspase3 陽性の細胞数を測定した。

Cleaved Caspase3 : アポトーシスのマーカー

3-5 Arf6 は OPC 遊走ガイダンス因子の放出を制御する

これまでの結果から、Arf6 によるミエリン髄鞘形成への関与は OPC の遊走制御を介して行っている事がわかった。さらに、OPC 遊走の制御には神経細胞での Arf6 の働きが重要であることから、Arf6 による OPC の遊走制御は OPC の内的要因ではなく、神経細胞などによる外的要因によって制御されていることがわかった。これまでの研究から、ミエリン髄鞘形成過程における OPC の遊走を制御する外的要因として、遊走先である標的領域から放出されるガイダンス因子による制御が知られている (de Castro and Bribián, 2005; Klämbt, 2009; Miller, 2002)。そこで私は、Arf6 がガイダンス因子の放出を介して OPC の遊走を制御しているかを検討した。海馬采を構成する軸索の多くは海馬の神経細胞に由来する(Cassel et al., 1997)。そこで、私は海馬から海馬采へと OPC 遊走ガイダンス因子が放出されていると考え、海馬を組織培養し、培養上清中に OPC 遊走ガイダンス因子が放出されているかを 24-well Boyden chamber に

よる *in vitro* 遊走アッセイを用いて検討した。その結果、海馬組織の培養上清は OPC の遊走を誘導することがわかった(図 25)。

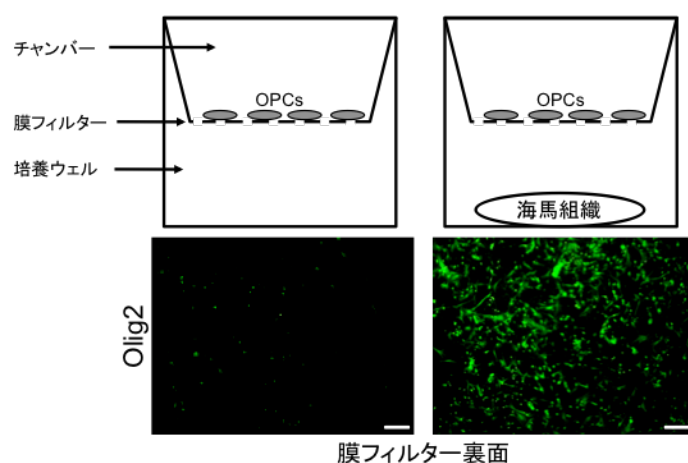


図 25 海馬組織培養上清の OPC の遊走に対する作用の検討

OPC の遊走は 24-well Boyden chamber を用いて測定した。OPC をチャンバーの膜フィルター上に播き、培養ウェルに生後 5 日目の Control マウスの海馬組織を置いた物と培地のみの物を用意して 3 日間培養した。培養後膜フィルターの裏面を抗 Olig2 抗体(緑色)で染色した。

Scale bar : 200 μ m。

Olig2 : オリゴデンドロサイト/OPC のマーカー

さらに、海馬組織の培養上清によって遊走されてくる OPC の数は、Control 海馬組織にくらべ *N-Arf6-CKO* 海馬組織で有意に少ない事がわかった(図 26)。

このことは海馬組織から OPC の遊走ガイダンス因子が放出されており、その放出は神経細胞での *Arf6* の欠損によって減少したことを示している。この結果から海馬組織の神経細胞において *Arf6* が OPC の遊走ガイダンス因子の放出または産生に関与する事が示唆された。

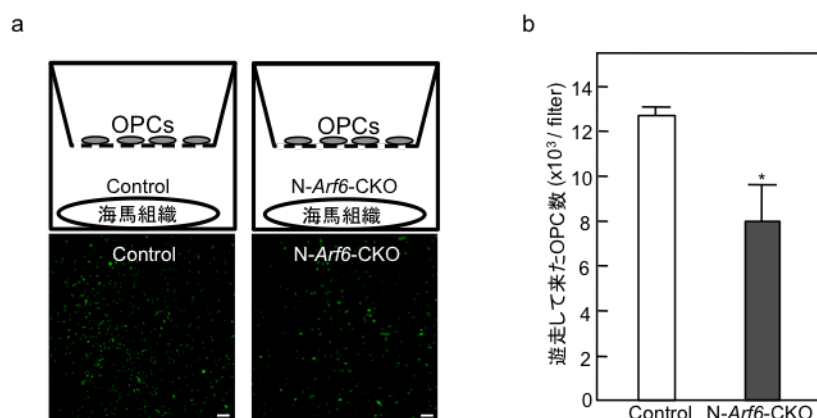


図 26 OPC 遊走制御に対する海馬組織での Arf6 の役割の検討

a. 膜フィルター裏面へと遊走してきた OPC を抗 Olig2 抗体で染色した。Scale bar : 200 μ m。

b. 膜フィルター裏面上の Olig2 陽性の細胞数を測定した。* $P < 0.05$ 。

Olig2 : オリゴデンドロサイト/OPC のマーカー

次に私は、Arf6 が制御する OPC 遊走ガイダンス因子の同定を試みた。これまでに *in vitro* の実験によっていくつかの OPC 遊走ガイダンス因子が同定されている(de Castro and Bribián, 2005; Klämbt, 2009; Miller, 2002)。その中の 1 つにグルタミン酸がある。OPC は AMPA 受容体と NMDA 受容体を発現しており、グルタミン酸が同受容体を介して OPC の遊走を誘引できることが *in vitro* 遊走アッセイ実験において示されている(Gudz et al., 2006)。さらに、生後 14 日目までの脳梁などの白質においてミエリン化される前の軸索からグルタミン酸が放出されることも知られており(Ziskin et al., 2007)、その放出期間はミエリン髄鞘形成過程での OPC の遊走期間と一致する。また、これまでに Arf6 が下流因子である PLD や PIP5K を介してグルタミン酸の放出を制御していることが *in vitro* の実験により知られている(Zheng and Bobich. 2004)。これらのことから、私はまず始めに、Arf6 が制御する OPC 遊走ガイダンス因子がグルタミン酸である可能性を調べた。酵素反応による定量法にて海馬組織培養上清中のグルタミン酸量を調べた結果、培養上清中に放出されたグルタミン酸量は

Control と N-*Arf6*-CKO の間で有意な差は見られなかった(図 27a)。この結果より *Arf6* が制御する OPC 遊走ガイダンス因子はグルタミン酸ではないと考えた。次に私は *Arf6* が制御する OPC 遊走ガイダンス因子として fibroblast growth factor (FGF)-2 に注目した。FGF-2 は主要な OPC 遊走ガイダンス因子の 1 つであり、海馬での発現が高く、その放出には *Arf6* の下流因子である PIP5K による PIP2 の産生が重要であることが知られている(de Castro and Bribián, 2005; Monfils et al., 2006; Steringer et al., 2012)。私は ELISA 法によって海馬組織培養上清中の FGF-2 量を調べた。その結果、培養液中に放出された FGF-2 量は Control に比べ N-*Arf6*-CKO 海馬組織で有意に低かった(図 27d)。この結果より *Arf6* が制御するガイダンス因子は FGF-2 である可能性が示唆された。しかし、この *Arf6* 欠損による海馬組織培養上清中での FGF-2 量の減少が FGF-2 の放出の減少によるものか、FGF-2 の産生量の減少によるものかは不明なままであった。そこで次に私は Control と N-*Arf6*-CKO の海馬組織中の FGF-2 含有量を測定した。その結果、海馬組織中の FGF-2 含有量には Control と N-*Arf6*-CKO の間で有意な差は見られなかった(図 27c)。このことから、*Arf6* は FGF-2 の産生ではなく放出に関与している事が示唆された。

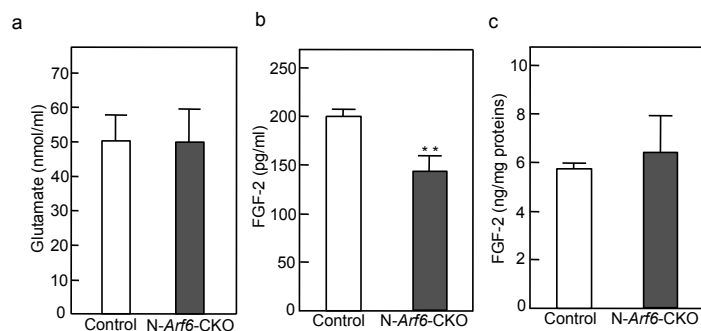


図 27 *Arf6* が関与する OPC 遊走ガイダンス因子の同定

- 海馬組織培養上清中のグルタミン酸量を測定した。
- 海馬組織培養上清中の FGF-2 量を測定した。 ** $P < 0.01$ 。
- 海馬組織中の FGF-2 量を測定した。

第 4 章 考察

胎生致死であった *Arf6*-KO マウスとは異なり (Suzuki et al., 2006)、本研究で作製した神経系特異的な *Arf6*-CKO マウスは正常に出生し、成体まで成長した。また、成体の脳を摘出・観察したところ、形態には大きな異常は見られなかった (図 8b)。このことから、神経系での *Arf6* は脳組織構造の形成、発達には重要ではないと考えられる。また、*in vitro* の研究から *Arf6* は神経細胞において軸索の伸張や神経伝達物質の放出、シナプスの形成など多くの神経機能に関与していることが示されてきた (Jaworski, 2007)。しかし、私が作製した B-*Arf6*-CKO マウスには特に目立った行動異常は観察されず、上記の神経機能障害を示すような表現型は見られなかった。これまでの研究から *Arf6* はいくつかの活性化因子である GEF とエフェクター分子を他の *Arf* ファミリーメンバーと共有していることが知られている (Donaldson and Jackson, 2011)。そのため、私は *Arf6* が *in vivo* で欠損した際は、他の *Arf* ファミリーによって *Arf6* が担っている神経機能が代行されている可能性があると考ええる。

本研究において、唯一、見られた *Arf6* 欠損による脳組織の構造変化は有髄神経線維の束からなる海馬采と脳梁の萎縮であった (図 9)。さらに萎縮していた両領域ではミエリン化された太い有髄神経線維が劇的に減少していた (図 10 および 11)。軸索の径 (大きさ) は有髄化されることで大きくなることから、有髄神経線維の束からなる海馬采や脳梁が萎縮した原因はミエリン髄鞘形成不全によって径の大きい軸索が減少した事に起因するものと考えられる。

さらに他の有髄神経領域 (脳弓, 大脳脚, 小脳) では *Arf6* 欠損によるミエリン髄鞘への影響は見られなかった (図 12)。このことからミエリン髄鞘形成には *Arf6* に依存的なものと非依存的なものがあり、ミエリン髄鞘形成を制御する分子が有髄神経領域によって異なる事が示唆された。また、運動機能などを司

る小脳では正常なミエリン髄鞘の形成が行われていることは *B-Arf6-CKO* マウスが一見してわかるような行動異常を示さない事の説明になるものと考ええる。

また、本研究は海馬神経細胞において *Arf6* が *FGF-2* の放出を制御することで、*OPC* の遊走を制御している可能性を示した。しかしながら、*Arf6* が *FGF-2* の放出を制御する分子メカニズムの解明には至っていない。*FGF-2* の放出は小胞輸送によらない *unconventional secretion pathway* を介して放出されることが知られている。この放出経路において、*FGF-2* は細胞膜上の *PIP2* に直接結合する事で細胞質から細胞膜へとリクルートされ、その後、細胞膜を通り抜けて放出される(Nickel, 2011)。この細胞膜上での *PIP2* の産生には *PIP5K* が重要であることが報告されている(Steringer et al., 2012)。*Arf6* は細胞膜上において *PIP5K* を活性化することで *PIP2* の産生を制御することが知られており(Funakoshi et al., 2011)、この事から私は、*Arf6* は *PIP5K* を介して *FGF-2* の放出を制御していると予想する。

本研究で作製した *B-Arf6-CKO* マウスおよび *N-Arf6-CKO* マウスは一見してわかるような病態を示さなかった。しかし、これまでに海馬采や脳梁の形成不全は記憶や認知能力の低下といった記憶障害や鬱などの精神疾患を引き起こす事が報告されている(Addy et al., 2005; Brambilla et al., 2004; Rao et al., 2011; Caetano et al., 2008)。そのため、*Arf6* が欠損したマウスも記憶障害や精神疾患などの病態を引き起こしている可能性が高いと考える。今後、記憶力や認知機能への影響、精神状態を行動学的解析により検討することで、*Arf6* 欠損によるミエリン髄鞘形成障害が個体レベルでどのような病態にリンクするのかを明らかにできるものと期待する。

第 5 章 結論

本研究において私は *Arf6* が個体レベルでどのような神経機能に関与しているのかを解析することを目的とした。

本研究において作製した神経系特異的な *Arf6*-CKO マウスの海馬采、脳梁では軸索のミエリン化が減少していた。このことから中枢神経系において、*Arf6* が軸索のミエリン髄鞘形成に必須である事がわかった。また、免疫組織染色および BrdU を用いた *in vivo* 遊走実験によって、*Arf6* はミエリン髄鞘形成過程において OPC の遊走を制御している事がわかった。さらに、神経細胞特異的な *Arf6*-CKO マウス、オリゴデンドロサイト特異的な *Arf6*-CKO マウスの 2 種類の *Arf6*-CKO マウスを作製、解析した結果、神経細胞での *Arf6* の働きがミエリン髄鞘形成および OPC の遊走制御に重要である事が示された。この *Arf6* による OPC の遊走制御は、海馬組織培養上清を用いた OPC の *in vitro* 遊走アッセイの結果から、OPC 遊走ガイダンス因子の放出を介したものである事が示された。さらに、*Arf6* の欠損は海馬組織からの FGF-2 の放出を減少させることがわかった。FGF-2 は OPC の遊走ガイダンス因子として知られているため、*Arf6* は FGF-2 の放出を介して OPC の遊走を制御している可能性が示唆された。

これら本研究で得られた知見から、*Arf6* は神経細胞からの FGF-2 の放出を介して OPC の遊走を制御することで海馬采や脳梁でのミエリン髄鞘形成に関与していることが明らかとなった。

本研究で明らかにされたミエリン髄鞘形成における *Arf6* の役割は、*Arf6* の個体での神経機能を解明した点で低分子量 G 蛋白質領域の基礎研究において重要な発見であると考えられる。

また、これまで、*in vitro* の研究から OPC の遊走を制御するガイダンス因子

は同定されていたが、実際に生体での具体的なガイダンス因子の働きは解析されていなかった。そのため、本研究が示した知見はミエリン髄鞘形成の研究においても重要度が高いものと考えられる。

さらに、本研究の結果、**Arf6** のミエリン髄鞘形成における役割が明らかになったことで、ミエリン髄鞘形成の新たな分子機構が解明されただけでなく、今後ミエリン髄鞘に起因する疾患の原因解明や新たな治療方法の開発に繋がる可能性があり、本研究で得られた知見は生物学だけでなく基礎医学の分野においても大変意義のあるものだと考える。

参考文献

Addy NA, Pocivavsek A, Levin ED. Reversal of clozapine effects on working memory in rats with fimbria-fornix lesions. *Neuropsychopharmacology*. 2005. 30, 1121-7.

Aggarwal S, Yurlova L, Simons M. Central nervous system myelin: structure, synthesis and assembly. *Trends Cell Biol*. 2011. 21, 585-93.

Akiyama M, Zhou M, Sugimoto R, Hongu T, Furuya M, Funakoshi Y, Kato M, Hasegawa H, Kanaho Y. Tissue- and development-dependent expression of the small GTPase Arf6 in mice. *Dev Dyn*. 2010. 239, 3416-35.

Altschuler Y, Liu S, Katz L, Tang K, Hardy S, Brodsky F, Apodaca G, Mostov K. ADP-ribosylation factor 6 and endocytosis at the apical surface of Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol*. 1999. 147, 7-12.

Baumann N, Pham-Dinh D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev*. 2001. 81, 871-927.

Bourne HR, Sanders DA, McCormick F. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature*. 1990. 348, 125-32.

Brambilla P, Nicoletti M, Sassi RB, Mallinger AG, Frank E, Keshavan MS, Soares JC. Corpus callosum signal intensity in patients with bipolar and

unipolar disorder. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2004. 75, 221-5.

Caetano SC, Silveira CM, Kaur S, Nicoletti M, Hatch JP, Brambilla P, Sassi R, Axelson D, Keshavan MS, Ryan ND, Birmaher B, Soares JC. Abnormal corpus callosum myelination in pediatric bipolar patients. *J Affect Disord*. 2008. 108, 297-301.

Casanova JE. Regulation of Arf activation: the Sec7 family of guanine nucleotide exchange factors. *Traffic*. 2007. 8, 1476-85.

Cassel JC, Duconseille E, Jeltsch H, Will B. The fimbria-fornix/cingular bundle pathways: a review of neurochemical and behavioural approaches using lesions and transplantation techniques. *Prog Neurobiol*. 1997. 51, 663-716.

Catherine Gauthier-Campbell, David S. Bredt, Timothy H. Murphy, Alaa El-Din El-Husseini. Regulation of Dendritic Branching and Filopodia Formation in Hippocampal Neurons by Specific Acylated Protein Motifs. *Mol Biol Cell*. 2004. 15, 2205–2217.

Cavenagh MM, Whitney JA, Carroll K, Zhang C, Boman AL, Rosenwald AG, Mellman I, Kahn RA. Intracellular distribution of Arf proteins in mammalian cells. Arf6 is uniquely localized to the plasma membrane. *J Biol Chem*. 1996. 271, 21767-21774.

Choi M, Rolle S, Wellner M, Cardoso MC, Scheidereit C, Luft FC, Kettritz R. Inhibition of NF-kappaB by a TAT-NEMO-binding domain peptide accelerates constitutive apoptosis and abrogates LPS-delayed neutrophil apoptosis. *Blood*. 2003. 102, 2259-2267.

de Castro F, Bribián A. The molecular orchestra of the migration of oligodendrocyte precursors during development. *Brain Res Rev*. 2005. 49, 227-41.

Dent EW, Gertler FB. Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron*. 2003. 40, 209–227.

Di Paolo G, De Camilli P. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature*. 2006. 443, 651-657.

Donaldson JG, Finazzi D, Klausner RD. Brefeldin A inhibits Golgi membrane-catalysed exchange of guanine nucleotide onto ARF protein. *Nature*. 1992. 360, 350-352.

Donaldson JG, Jackson CL. ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011. 12, 362-375.

Donaldson JG, Porat-Shliom N, Cohen LA. Clathrin-independent endocytosis: a unique platform for cell signaling and PM remodeling. *Cell*

Signal. 2009. 21, 1-6.

Esteban JA. AMPA receptor trafficking: a road map for synaptic plasticity. Mol. Interv. 2003. 3, 375–385.

Fukazawa Y, Saitoh Y, Ozawa F, Ohta Y, Mizuno K, Inokuchi K. Hippocampal LTP is accompanied by enhanced F-actin content within the dendritic spine that is essential for late LTP maintenance in vivo. Neuron. 2003. 38, 447–460.

Funakoshi Y, Hasegawa H, Kanaho Y. Regulation of PIP5K activity by Arf6 and its physiological significance. J Cell Physiol. 2011. 226, 888-95.

Galas MC, Helms JB, Vitale N, Thierse D, Aunis D, Bader MF. Regulated exocytosis in chromaffin cells. A potential role for a secretory granule-associated ARF6 protein. J Biol Chem. 1997. 272, 2788-2793.

Gillingham AK, Munro S. The small G proteins of the Arf family and their regulators. Annu Rev Cell Dev Biol. 2007. 23, 579-611.

Grosse G, Grosse J, Tapp R, Kuchinke, Gorsleben M, Fetter I, Hohne-Zell B, Gratzl M, Bergmann M. SNAP-25 requirement for dendritic growth of hippocampal neurons. J Neurosci Res. 1999. 56, 539–546.

Gudz TI, Komuro H, Macklin WB. Glutamate stimulates oligodendrocyte

progenitor migration mediated via an α 5 β 1 integrin/myelin proteolipid protein complex. *J Neurosci*. 2006. 26, 2458-2466.

Hamano K, Takeya T, Iwasaki N, Nakayama J, Ohto T, Okada Y. A quantitative study of the progress of myelination in the rat central nervous system, using the immunohistochemical method for proteolipid protein. *Brain Res Dev Brain Res*. 1998. 108, 287-293.

Hashimoto S, Onodera Y, Hashimoto A, Tanaka M, Hamaguchi M, Yamada A, Sabe H. Requirement for Arf6 in breast cancer invasive activities. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004. 101, 6647-6652.

Helms JB, Rothman JE. Inhibition by brefeldin A of a Golgi membrane enzyme that catalyses exchange of guanine nucleotide bound to ARF. *Nature*. 1992. 360, 352-354.

Hernandez-Deviez DJ, Roth MG, Casanova JE, Wilson JM. ARNO and ARF6 regulate axonal elongation and branching through downstream activation of phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase α . *Mol Biol Cell*. 2004. 15, 111-120.

Hernández-Deviez DJ, Roth MG, Casanova JE, Wilson JM. ARNO and ARF6 regulate axonal elongation and branching through downstream activation of phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase α . *Mol Biol Cell*. 2004. 15, 111-120.

Honda A, Nogami M, Yokozeki T, Yamazaki M, Nakamura H, Watanabe H, Kawamoto K, Nakayama K, Morris AJ, Frohman MA, Kanaho Y. Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase alpha is a downstream effector of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation. *Cell*. 1999. 99, 521-532.

"

Hosaka M, Toda K, Takatsu H, Torii S, Murakami K, Nakayama K. Structure and intracellular localization of mouse ADP-ribosylation factors type 1 to type 6 (ARF1-ARF6). *J Biochem*. 1996. 120, 813-9.

Isaka F, Ishibashi M, Taki W, Hashimoto N, Nakanishi S, Kageyama R. Ectopic expression of the bHLH gene *Math1* disturbs neural development. *Eur J Neurosci*. 1999. 11, 2582-8.

Jaworski J. ARF6 in the nervous system. *Eur J Cell Biol*. 2007. 86, 513-24.

Kahn RA, Gilman AG. Purification of a protein cofactor required for ADP-ribosylation of the stimulatory regulatory component of adenylate cyclase by cholera toxin. *J Biol Chem*. 1984. 259, 6228-6234.

Klämbt C. Modes and regulation of glial migration in vertebrates and invertebrates. *Nat Rev Neurosci*. 2009. 10, 769-779.

Kramar EA, Lin B, Rex CS, Gall CM, Lynch G. Integrin-driven actin polymerization consolidates long-term potentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006. 103, 5579–5584.

Krämer-Albers EM, White R. From axon-glia signalling to myelination: the integrating role of oligodendroglial Fyn kinase. *Cell Mol Life Sci*. 2011. 68, 2003-2012.

Krauss M, Kinuta M, Wenk MR, De Camilli P, Takei K, Haucke V. ARF6 stimulates clathrin/AP-2 recruitment to synaptic membranes by activating phosphatidylinositol phosphate kinase type Iγ. *J Cell Biol*. 2003. 162, 113-124.

Lappe-Siefke C, Goebbels S, Gravel M, Nicksch E, Lee J, Braun PE, Griffiths IR, Nave KA. Disruption of Cnp1 uncouples oligodendroglial functions in axonal support and myelination. *Nat Genet*. 2003. 33, 366-374.

Lawrence JT, Birnbaum MJ. ADP-ribosylation factor 6 regulates insulin secretion through plasma membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003. 100, 13320-13325.

Li J, Peters PJ, Bai M, Dai J, Bos E, Kirchhausen T, Kandror KV, Hsu VW. An ACAP1-containing clathrin coat complex for endocytic recycling. *J Cell Biol*. 2007. 178, 453-64.

Luders E, Thompson PM, Toga AW. The development of the corpus callosum in the healthy human brain. *J Neurosci*. 2010. 30, 10985-90.

Luo L. Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity. *Annu. Rev. Cell Dev Biol*. 2002. 18, 601–635.

Malenka RC. Synaptic plasticity and AMPA receptor trafficking. *Ann NY Acad Sci*. 2003. 1003, 1–11.

Matsukawa J, Nakayama K, Nagao T, Ichijo H, Urushidani T. Role of ADP-ribosylation factor 6 (ARF6) in gastric acid secretion. *J Biol Chem*. 2003. 278, 36470-36475.

Matus A. Actin-based plasticity in dendritic spines. *Science*. 2000. 290, 754–758.

Miller RH. Regulation of oligodendrocyte development in the vertebrate CNS. *Prog Neurobiol*. 2002. 67, 451-67.

Miyazaki H, Yamazaki M, Watanabe H, Maehama T, Yokozeki T, Kanaho Y. The small GTPase ADP-ribosylation factor 6 negatively regulates dendritic spine formation. *FEBS Lett*. 2005. 579, 6834-6838.

Monfils MH, Driscoll I, Melvin NR, Kolb B. Differential expression of basic fibroblast growth factor-2 in the developing rat brain. *Neuroscience*. 2006.

141, 213-221.

Morishige M, Hashimoto S, Ogawa E, Toda Y, Kotani H, Hirose M, Wei S, Hashimoto A, Yamada A, Yano H, Mazaki Y, Kodama H, Nio Y, Manabe T, Wada H, Kobayashi H, Sabe H. GEP100 links epidermal growth factor receptor signalling to Arf6 activation to induce breast cancer invasion. *Nat Cell Biol.* 2008. 10, 85-92.

Moss J, Vaughan M. Molecules in the ARF orbit. *J Biol Chem.* 1998. 273, 21431-21434.

Muramatsu K, Hashimoto Y, Uemura T, Kunii M, Harada R, Sato T, Morikawa A, Harada A. Neuron-specific recombination by Cre recombinase inserted into the murine tau locus. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008. 370, 419-423.

Nickel W. The unconventional secretory machinery of fibroblast growth factor 2. *Traffic.* 2011. 12, 799-805.

Osmani N, Peglion F, Chavrier P, Etienne-Manneville S. Cdc42 localization and cell polarity depend on membrane traffic. *J Cell Biol.* 2010. 191, 1261-9.

Palacios F, Price L, Schweitzer J, Collard JG, D'Souza-Schorey C. An essential role for ARF6-regulated membrane traffic in adherens junction turnover and epithelial cell migration. *EMBO J.* 2001. 20, 4973-4986.

Park M, Salgado JM, Ostroff L, Helton TD, Robinson CG, Harris KM, Ehlers MD. Plasticity-induced growth of dendritic spines by exocytic trafficking from recycling endosomes. *Neuron*. 2006. 52, 817–830.

Pasqualato S, Renault L, Cherfils J. Arf, Arl, Arp and Sar proteins: a family of GTP-binding proteins with a structural device for 'front-back' communication. *EMBO Rep*. 2002. 3, 1035-1041.

Paul LK, Brown WS, Adolphs R, Tyszka JM, Richards LJ, Mukherjee P, Sherr EH. Agenesis of the corpus callosum: genetic, developmental and functional aspects of connectivity. *Nat Rev Neurosci*. 2007. 8, 287-299.

Perez-Mansilla B, Ha VL, Justin N, Wilkins AJ, Carpenter CL, Thomas GM. The differential regulation of phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinases and phospholipase D1 by ADP-ribosylation factors 1 and 6. *Biochim Biophys Acta*. 2006. 1761, 1429-1442.

Powelka AM, Sun J, Li J, Gao M, Shaw LM, Sonnenberg A, Hsu VW. Stimulation-dependent recycling of integrin beta1 regulated by ARF6 and Rab11. *Traffic*. 2004. 5, 20-36.

Premont RT, Schmalzigaug R. Metastasis: wherefore arf thou? *Curr Biol*. 2009.19, 1036-1038.

Radhakrishna H, Al-Awar O, Khachikian Z, Donaldson JG. ARF6 requirement for Rac ruffling suggests a role for membrane trafficking in cortical actin rearrangements. *Journal of Cell Science*. 1999. 112, 855-866.

Radhakrishna H, Donaldson JG. ADP-ribosylation factor 6 regulates a novel plasma membrane recycling pathway. *J Cell Biol*. 1997. 139, 49-61.

Randazzo PA, Inoue H, Bharti S. Arf GAPs as regulators of the actin cytoskeleton. *Biol Cell*. 2007. 99, 583-600.

Rao NP, Venkatasubramanian G, Arasappa R, Gangadhar BN. Relationship between corpus callosum abnormalities and schneiderian first-rank symptoms in antipsychotic-naïve schizophrenia patients. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 2011. 23, 155-162.

Shirane M, Nakayama KI. Protrudin induces neurite formation by directional membrane trafficking. *Science*. 2006. 314, 818–821.

Song J, Khachikian Z, Radhakrishna H, Donaldson JG. Localization of endogenous ARF6 to sites of cortical actin rearrangement and involvement of ARF6 in cell spreading. *J Cell Sci*. 1998. 111, 2257-2267.

Stace CL, Ktistakis NT. Phosphatidic acid- and phosphatidylserine-binding proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2006. 1761, 913-926.

Steringer JP, Bleicken S, Andreas H, Zacherl S, Laussmann M, Temmerman K, Contreras FX, Bharat TA, Lechner J, Müller HM, Briggs JA, García-Sáez AJ, Nickel W. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P₂)-dependent oligomerization of fibroblast growth factor 2 (FGF2) triggers the formation of a lipidic membrane pore implicated in unconventional secretion. *J Biol Chem.* 2012. 287, 27659-27669.

Suzuki T, Kanai Y, Hara T, Sasaki J, Sasaki T, Kohara M, Maehama T, Taya C, Shitara H, Yonekawa H, Frohman MA, Yokozeki T, Kanaho Y. Crucial role of the small GTPase ARF6 in hepatic cord formation during liver development. *Mol Cell Biol.* 2006. 26, 6149-6156.

Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev.* 2001. 81, 153-208.

Tanabe K, Kon S, Natsume W, Torii T, Watanabe T, Satake M. Involvement of a novel ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein, SMAP, in membrane trafficking: implications in cancer cell biology. *Cancer Sci.* 2006. 97, 801-806.

Tojima T, Akiyama H, Itofusa R, Li Y, Katayama H, Miyawaki A, Kamiguchi H. Attractive axon guidance involves asymmetric membrane transport and exocytosis in the growth cone. *Nat Neurosci.* 2007. 10, 58–66.

Tsuchiya M, Price SR, Tsai SC, Moss J, Vaughan M. Molecular identification

of ADP-ribosylation factor mRNAs and their expression in mammalian cells. J Biol Chem. 1991. 266, 2772-2777.

Vitale N, Chasserot-Golaz S, Bailly Y, Morinaga N, Frohman MA, Bader MF. Calcium-regulated exocytosis of dense-core vesicles requires the activation of ADP-ribosylation factor (ARF)6 by ARF nucleotide binding site opener at the plasma membrane. J Cell Biol. 2002. 159, 79-89.

Wolff NA, Lee WK, Abouhamed M, Thévenod F. Role of ARF6 in internalization of metal-binding proteins, metallothionein and transferrin, and cadmium-metallothionein toxicity in kidney proximal tubule cells. Toxicol Appl Pharmacol. 2008. 230, 78-85.

Zheng Q, Bobich JA. ADP-ribosylation factor6 regulates both [3H]-noradrenaline and [14C]-glutamate exocytosis through phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. Neurochem Int. 2004. 45, 633-640.

Ziskin JL, Nishiyama A, Rubio M, Fukaya M, Bergles DE. Vesicular release of glutamate from unmyelinated axons in white matter. Nat Neurosci. 2007. 10, 321-330.

謝辞

本研究を行うにあたりまして、終始適切な御指導と有益な御助言を賜りました筑波大学・人間総合科学研究科の金保安則教授に深く感謝し、心よりお礼申し上げます。また、本研究の遂行におきまして、常に暖かい御指導と有益な御助言を賜りました筑波大学・人間総合科学研究科の長谷川潤准教授に深く感謝し、心よりお礼申し上げます。さらに、神経系特異的 Arf6 欠損マウスの脳での組織解析におきまして御指導いただきました北里大学医学部の阪上洋行教授に深く感謝し、心よりお礼申し上げます。

最後に、研究室内外におきまして大変お世話になりました研究室の皆様に深く感謝いたします。